
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**CORRELACIÓN ENTRE ECO-DOPPLER VENOSO Y
ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO: EFECTO DE LA
BIPEDESTACIÓN**

TESIS DOCTORAL

MARÍA RUBIO MONTAÑA

2013



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

SILVIA M. ARRIBAS RODRIGUEZ, Profesor Titular del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

LUIS A. CONDEZO-HOYOS. Responsable de Investigación de la empresa GEC S.L de Madrid.

CERTIFICAN

Que Dña MARÍA RUBIO MONTAÑA ha realizado bajo su dirección el trabajo: “CORRELACIÓN ENTRE ECO-DOPPLER VENOSO Y ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO: EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN ” con objeto de obtener el Grado de Doctor.

DIRECTORES

Dra Arribas Rodriguez Silvia M.

Dr Condezo Hoyos Luis A.



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

“Este trabajo ha sido financiado con fondos I.M.A.D.E de la Comunidad Autónoma de Madrid y la Unión Europea 2010”



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Dedicatorias

A mis hijos Gonzalo y Álvaro que nacieron mientras se gestaba este trabajo.

A mi marido José Antonio, por su paciencia durante las horas que dedico a mi profesión.

A mis padres, por la ayuda sin la cual no hubiera sido posible el tiempo que he dedicado a este trabajo.



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Agradecimientos

De manera especial al Dr Gabriel España Caparrós, el cual ha puesto todo su empeño en que este trabajo salga adelante, apoyando mi formación en todos los aspectos posibles en los que debe estar preparado un Cirujano.

A la Dra Silvia M. Arribas Rodríguez por haber puesto su dedicación, paciencia y conocimiento en la elaboración de este trabajo

Al Dr Luis Alberto Condezo-Hoyos por su capacidad docente e investigadora sin la cual no hubiera sido posible realizar estos experimentos.

A los compañeros del Hospital Moncloa, en especial a Nadia, que han participado en este estudio.

ÍNDICE

INDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	II
RESUMEN.....	III
A. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA.....	2
1. Anatomía y fisiología del sistema venoso de las extremidades inferiores. 2	
2 .Definición de insuficiencia venosa crónica (IVC).	5
3. Epidemiología de la IVC.	5
4. Etiología de la IVC. Teorías patogénicas.....	11
5. Clasificación de la IVC.	17
6. Estudio eco-doppler.	19
7. Tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.....	22
7.1. Cirugía.	22
7.2. Tratamiento farmacológico de la IVC.....	24
B. ESTRÉS OXIDATIVO	27
1. Radicales libres (RL).....	28
1.1 Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$).	29
1.2. El radical hidroxilo ($\bullet OH$).....	29
1.3. Radical peroxilo ($ROO\bullet$).....	29
1.4 Óxido nítrico ($NO\bullet$).....	30

1.5. Anión peroxinitrito (ONOO ⁻).....	31
1.6. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).	31
2. Sistemas enzimáticos productores de ROS / RNS.	32
2.1. NADPH oxidasa.	32
2.2. Xantina oxidasa.	33
2.3. Mieloperoxidasa.....	33
2.4. Sintasa de óxido nítrico.....	34
3. Principales mecanismos de defensa antioxidante endógenos.....	35
3.1. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.	35
3.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).	35
3.1.2. Catalasa.....	36
3.1.3. Glutatión peroxidasa.	37
3.2. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.	38
3.2.1. Glutatión.....	38
3.2.2. Ácido ascórbico.....	39
3.2.3. Vitamina E.....	40
3.2.4. Coenzima Q10.....	40
3.2.5. Ácido úrico	40
C. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	42
1. Principales biomarcadores.....	45
1.1 Carbonilos, biomarcador de oxidación proteica.	45
1.2. 3-nitrotirosina, biomarcador de oxidación proteica.....	46
D. ESFUERZO DE CORTE.	47
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
A. HIPÓTESIS.....	51
B. OBJETIVOS	52

MATERIAL Y MÉTODOS	54
MATERIALES	55
1. Sujetos de estudio.....	55
2. Reactivos.....	56
3. Equipos	59
B.MÉTODOS.....	59
1. Diagnóstico clínico.....	59
2. Diagnóstico eco-doppler.....	60
3. Obtención del parámetro doppler.....	64
4. Extracción de las muestras de sangre.....	66
5. Preparación del plasma.....	66
6. Cuantificación de la capacidad antioxidante.....	67
6.1. Método CUPRAC-BCS.	67
6.1.1. Fundamento.....	67
6.1.2. Protocolo experimental	68
6.1.3. Cálculo del valor TAC.	68
6.2. Método SOSA.....	69
6.2.1. Fundamento.....	69
6.2.2. Protocolo experimental.	70
6.2.3. Cálculo del valor SOSA	71
6.3. Cuantificación de tioles totales.....	72
6.3.1. Fundamento.....	72
6.3.2. Protocolo experimental	73
6.3.3. Cálculos	74
6.4. Determinación de la actividad catalasa	75
6.4.1. Fundamento.....	75

6.4.2 Protocolo experimental.	76
6.4.3 Cálculos	77
7. Cuantificación de proteínas carboniladas totales	78
7.1 Fundamento.....	78
7.2. Protocolo experimental	79
7.3. Cálculos	80
8. Cuantificación de 3-nitrotirosina.....	81
8.1. Fundamento.....	81
8.2. Protocolo experimental	82
8.3. Cálculos	82
9. Cuantificación de nitritos	83
9.1. Fundamento.....	83
9.2. Protocolo experimental	84
9.3. Cálculos	85
10. Determinación del contenido de proteínas.....	86
11. Análisis estadístico.	86
RESULTADOS	87
A. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	88
1.A Inclusión de pacientes.	88
B. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	89
C. NITRITOS	95
D. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO. MARCADORES DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.	96
E. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS Y PARÁMETROS ANTIOXIDANTES.	98

F. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL PARÁMETRO ECOSUMA.	99
G. CORRELACIÓN DEL PARÁMETRO ECO-DOPPLER (ECOSUMA) CON LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS.	101
DISCUSIÓN	108
1. ENFERMEDAD VARICOSA Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS	109
2. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTADO OXIDATIVO EN PLASMA.	111
3. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLASMA.	118
4. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.	120
5. CORRELACIÓN DEL PARÁMETRO ECOSUMA Y LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS.	123
CONCLUSIONES	128
A. CONCLUSIONES	129
B.LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.	131
BIBLIOGRAFÍA	133
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	154

ABREVIATURAS

AGEs: Productos avanzados de glicación

AOPP: Productos avanzados de oxidación

ATP: Adenosín trifosfato

BCS: Ácido batocuproinedisulfónico

C.E.A.P: Clinical Etiologic Anatomicpatho Physiologic.

CTZ: Coelenterazina

DNPH: Dinitrofenilhidrazina

EAEO: Enfermedades asociadas con estrés oxidativo

GPx: Glutation peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HRP: Peroxidasa de rábano

IVC: Insuficiencia venosa crónica

KPP: Tampón fosfato

LOOH: Hidroperóxidos de ácidos grasos

MDA: Malondialdehido

MEC: Matriz extraceleular

MMII: Miembros inferiores

MMPS: Metaloproteinasas

MPO: Mieloperoxidasa

NADPH: Dinucleótido fosfato de adenin nicotinamida

NO•: Óxido nítrico

NOSS: Sintetas de óxido nítrico

O₂^{•-}: Anión superóxido

OH[•]: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Peroxidonitrito

ORAC: Oxigen Radical Absorbance Capacity

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

RL: Radical libre

RNS: Especies reactivas dependientes de nitrógeno

ROO[•]: Radical hidroperoxilo

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

SOSA: Superoxide Anion Scavenging Activity

TAC: Total antioxidant capacity

TIMPS: Inhibidores celulares de la metaloproteinasas

VSE: Vena safena externa

VSI: Vena safena interna

WSS: Wall Shear Stress

XO: Xantina oxidasa

RESUMEN

La insuficiencia venosa crónica (IVC) se define como la incapacidad del sistema venoso para llevar el flujo de sangre en dirección hacia el corazón, con independencia de la posición y actividad del cuerpo. Es una patología muy prevalente, que mayoritariamente clínicamente se manifiesta por la presencia de varices. Esencialmente, la IVC se caracteriza por la existencia de reflujo u obstrucción del drenaje venoso o una combinación de ambas, entendiendo por reflujo la existencia de un flujo retrogrado en sentido contrario al fisiológico.

La IVC supone un problema de salud que afecta principalmente a los países desarrollados, donde causa una alta morbilidad en la población adulta y tienen un elevado coste para los servicios sociosanitarios. Dificultades encontradas en los diferentes estudios epidemiológicos sobre los desórdenes venosos hacen imposible derivar conclusiones acerca de la prevalencia de la enfermedad. En conclusión, se presentan amplias variaciones en criterios diagnósticos, de prevalencia, metodología, etc...

Tradicionalmente la actividad prolongada en bipedestación ha sido considerada un factor de riesgo para el desarrollo de varices y ciertamente existe la creencia popular de que estar prolongadamente de pie condiciona su aparición. En su mayoría, esta dolencia la padecen personas de mediana edad que se encuentran en una etapa de actividad profesional, particularmente aquellas en las que su trabajo exige muchas horas de bipedestación. Así pues, la ergometría y la actividad física de una ocupación representan un factor epidemiológico clásicamente descrito en la patología venosa. La mayoría de los estudios epidemiológicos, pero no todos, indican que trabajar de pie en una posición de ortostatismo prolongado puede aumentar la prevalencia y severidad de la enfermedad. Estos resultados deben ser interpretados con cautela por los errores metodológicos de los estudios epidemiológicos.

Los mecanismos responsables de la insuficiencia venosa crónica no están totalmente esclarecidos. Entre las hipótesis sugeridas sobre el desarrollo de la enfermedad varicosa se encuentran la insuficiencia valvular primaria, la infiltración de células inflamatorias y el debilitamiento de la pared venosa. Todos estos mecanismos tienen en común una elevada producción de radicales libres que se

traduce en elevación de marcadores de estrés oxidativo en plasma. Se conoce también que la actividad laboral en bipedestación de forma prolongada produce aumento de ROS a nivel plasmático pero no se ha demostrado que existan marcadores de estrés oxidativo elevados en estas circunstancias.

. El objetivo principal de esta Tesis ha sido valorar el estado Oxidativo global de individuos que trabajan en bipedestación en comparación con sujetos que trabajan en sedestación, incluyendo marcadores de daño oxidativo de proteínas y de capacidad antioxidante en plasma que nos indique si hay daño inducido por la bipedestación. Puesto que el diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante eco-doppler; hemos evaluado si existe una asociación entre determinados patrones hemodinámicos y distintos parámetros plasmáticos de estado Oxidativo, independientemente de la actividad laboral, que sirvan como posibles marcadores diagnósticos de predisposición al desarrollo de enfermedad varicosa.

INTRODUCCIÓN

A. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA

1. Anatomía y fisiología del sistema venoso de las extremidades inferiores.

El sistema venoso actúa como un importante reservorio y conductor de sangre. Recibe la sangre desde los capilares y la lleva al corazón, en contra de la fuerza de gravedad y de una presión tóraco-abdominal fluctuante, careciendo de bomba propia. Para que el drenaje hacia el corazón se realice en forma adecuada, es necesario un sistema venoso permeable, con un sistema valvular y muscular (bomba válvulo-muscular) sano, además de una función cardíaca conservada. Las válvulas venosas son repliegues del endotelio con senos valvulares en forma de copa que se llenan desde arriba. Cuando están llenos, las cúspides de las válvulas ocluyen la luz de la vena, con lo que se impide el flujo distal de sangre. Además, las válvulas segmentan la columna sanguínea de forma que se reduce la presión retrógrada, lo que permite que el retorno venoso esté asegurado desde abajo hacia

arriba y de la superficie a la profundidad, impidiendo el reflujo (Zbrodowski et al., 1995, Putz et al., 2006, Eklöf, 2007). En posición erecta, la presión hidrostática de las venas dorsales del pie sería la de la columna de sangre continua desde la aurícula derecha hasta el pie, si no existieran las válvulas, que interrumpen y fraccionan la columna. Al contraerse la musculatura de la extremidad inferior, la presión aumenta, bombeando la sangre hacia el corazón. Al relajarse la musculatura, la presión cae produciendo reflujo, que es impedido por las válvulas.

El sistema venoso consta de un sistema superficial que drena la piel y el tejido subcutáneo y desemboca en el sistema profundo a través de los cayados y las venas perforantes y/o comunicantes. En el espacio subcutáneo se encuentran las venas superficiales, las cuales están interconectadas y drenan en dos venas principales: la safena interna (VSI) o mayor y la safena externa (VSE) o menor. Ambas están separadas por una membrana llamada fascia superficial o venosa, en un espacio subcutáneo más profundo, ubicado entre la fascia superficial y la fascia muscular, llamado compartimiento interfascial o safeno y un compartimiento subcutáneo verdadero, entre la fascia venosa y la piel. La VSI se origina en el dorso del pie, pasa por delante del maléolo interno y asciende hasta unirse con la vena femoral mediante el cayado de la safena, que atraviesa la fascia cribiforme, por debajo del ligamento inguinal en el triángulo de Scarpa. Existen múltiples variantes anatómicas a nivel del cayado y también a nivel del recorrido en relación con su fascia. La VSE se inicia en la región retro maleolar externa del pie, asciende por la parte posterior de la pierna, se coloca en el surco que separa los músculos gemelos y alcanza el hueco poplíteo, para perforar la fascia y desembocar en la vena poplítea.

El sistema venoso profundo, que es el responsable del 90% del retorno venoso, se encuentra por debajo de la fascia que rodea los músculos del muslo y de la pierna. Las venas del sistema venoso profundo siguen el trayecto de las arterias homónimas y de sus ramas. El sistema principal está constituido por tres troncos: tibioperoneo, poplíteo y femoral.

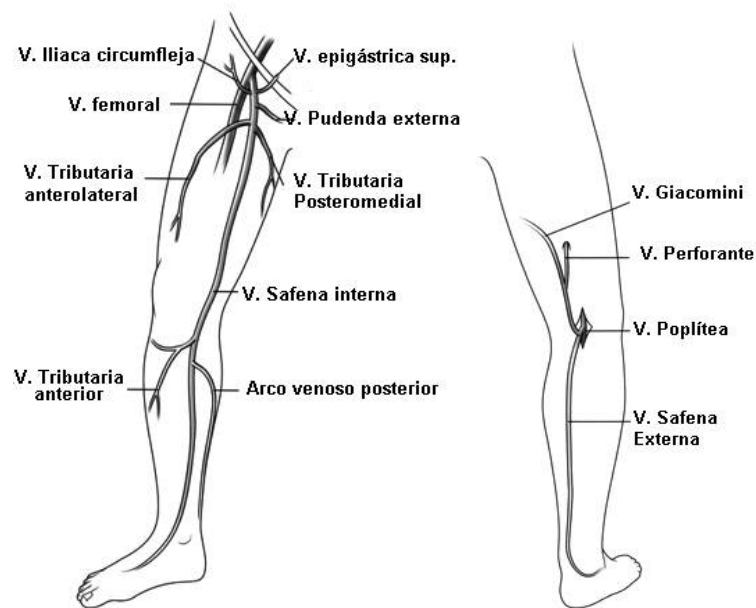


Figura 1. Anatomía de las principales venas de las extremidades inferiores.

(Adaptado de Estudio ecográfico de la insuficiencia venosa de miembros inferiores. Joan Falcó Fages)

Entre el sistema superficial y el profundo existen comunicaciones a través de venas perforantes. El sistema perforante está constituido por venas que drenan la sangre de la superficie hacia la profundidad, todas poseen válvulas, y en general provienen de las ramas colaterales de las safenas y no del tronco de éstas. Se han descrito más de 150 venas perforantes en los miembros inferiores, aunque son pocas las que tienen importancia clínica. Entre ellas cabe destacar la vena perforante de Dodd en el muslo, la perforante de Hunter en tercio distal de muslo, las de Boyd en el tercio superior de la pierna y las tres perforantes de Cocketts en la mitad inferior de la pierna.

2 .Definición de insuficiencia venosa crónica (IVC).

La insuficiencia venosa crónica (IVC) es la incapacidad del sistema venoso para conducir el flujo de sangre en dirección centrípeta hacia el corazón, con independencia de la posición y actividad del cuerpo. Es una patología muy prevalente, que clínicamente se manifiesta por la presencia de varices, telangiectasias, cambios tróficos de la piel y en estadios avanzados, aparición de úlceras. Esencialmente, la IVC se caracteriza por la existencia de reflujo u obstrucción del drenaje venoso o una combinación de ambas, entendiendo por reflujo la existencia de un flujo retrogrado en sentido contrario al fisiológico.

3. Epidemiología de la IVC.

La IVC supone un problema de salud que afecta principalmente a los países desarrollados, donde causa una alta morbilidad en la población adulta y tienen un elevado coste para los servicios sanitarios. Aunque los estudios epidemiológicos realizados en diferentes regiones del mundo evidencian enormes variaciones en la prevalencia de la insuficiencia venosa (Robertson et al., 2008), su incidencia es cada día más frecuente (Carpentier et al., 2004, Robertson et al., 2008). A nivel mundial se estima que afecta aproximadamente al 33% de la población.

En España, la IVC también es una dolencia con una elevada prevalencia, afectando a más de 6 millones de personas (Lozano et al., 2001, Callejas and Manasanch, 2004). La prevalencia de las varices varía según se trate de estadísticas nacionales de salud pública (0,5-4%), estadísticas hospitalarias (10-25%) o de estudios epidemiológicos (30-40%). El estudio DETECT-IVC 2006 (Álvarez et al.; 2008), tenía como objetivo verificar los elevados datos de prevalencia de IVC obtenidos en la encuesta DETECT-IVC del año 2000 y comprobar si se ha modificado el patrón del tratamiento de esta patología entre los médicos de atención primaria. Se trató de una encuesta con fines epidemiológicos, de tipo transversal, que incluyó 16.770 sujetos que acudían por cualquier motivo a una consulta de atención primaria. El 71% de los sujetos refería algún síntoma o signo dependiente de la IVC, especialmente la pesadez de piernas y las varículas. Un 62% de los encuestados presentaban algún tipo de signo de IVC en el examen físico. Se

identificaron úlceras cutáneas en un 2% de los examinados. Un 38% de los sujetos se encontraba dentro de los grupos del 2 al 6 de la clasificación CEAP, y un 88% de sujetos salían de la cita con tratamiento. Los resultados de la encuesta confirmaron la elevada prevalencia de la IVC en España, muy superior a las cifras comunicadas por los estudios referenciales.

Como se descubre de lo anteriormente descrito existe una enorme variabilidad en los datos estadísticos. Esto obedece a diferentes causas, entre otras a la población estudiada (la edad, el sexo, la raza) y a los diferentes métodos de medida (autoencuestas, eco-doppler, exploración física) (Robertson et al., 2008). Además, existen problemas metodológicos en los estudios epidemiológicos que deben ser abordados, como los sesgos de población ya que los participantes proceden de clínicas o consultas médicas y, puesto que no es una patología que amenace la vida, en muchos casos no son tratamientos cubiertos por los sistemas de salud. También existen errores de medición que pueden resultar en una sub o sobre estimación de la prevalencia. Por último se detecta un inadecuado control de los factores de confusión. En cualquier caso, la enfermedad venosa, además, presenta una elevada incidencia oculta, particularmente en sus estadios iniciales, estimándose que hay un elevado porcentaje de la población sin diagnosticar.

A continuación se presenta en la Tabla 1 un resumen de los problemas metodológicos.

Tabla 1. Resumen de los problemas metodológicos en los estudios epidemiológicos.

<i>Problemas de los estudios epidemiológicos</i>
<p>Diferentes metodologías de estudios</p> <p>Diversidad de criterios diagnósticos y carencia de un sistema de clasificación estándar</p> <p>Uso de encuestas, cuestionarios auto respondidos y referentes sesgados</p> <p>Diferencias en la composición de las poblaciones: edad, raza, género, localización geográfica,</p>

hábitos, etc. No son comparables

Prevalencia fuertemente dependiente de los criterios de inclusión, exclusión

Empleo de muestras no representativas de la población (hospitalaria, institucional, laboral)

Inconsistencia en el análisis estadístico (análisis bivariado exclusivo)

Dificultades encontradas en los diferentes estudios epidemiológicos sobre los desórdenes venosos hacen imposible derivar conclusiones acerca de la prevalencia de la enfermedad. En conclusión, se presentan amplias variaciones en criterios diagnósticos, de prevalencia, metodología, etc.

Desde el punto de vista etiológico, la causa y la secuencia de los eventos que conducen a tal ineficiencia en el flujo sanguíneo no están del todo claro. Se han propuesto diversos factores que pueden contribuir a la formación de varices. Podemos dividirlos en factores causales (primarios): entre ellos los genéticos, clásicamente se asocia a una historia familiar con patología venosa. Factores no modificables (secundarios): género y edad. Factores modificables (secundarios): paridad, terapias hormonales. Factores relacionados con el estilo de vida: ortostatismo laboral prolongado, sedentarismo prolongado, obesidad, estreñimiento, tabaquismo. Además, podemos clasificar los factores de riesgo según su nivel de asociación. Factores de riesgo con mayor fuerza de asociación con la patología venosa: factores genéticos, traumatismos de la pared venosa y la edad. Factores de riesgo con moderada asociación y resultados contradictorios en los estudios: género, paridad, hormonas, obesidad, ortostatismo prolongado. Factores de riesgo con asociación poco clara: sedentarismo, estreñimiento, otros hábitos de vida, etc...

El factor de riesgo más importante, independiente y no modificable descrito es la herencia. La historia familiar positiva en la patología varicosa nos hace pensar en una asociación genética y conlleva a un esfuerzo científico por identificar los genes implicados. Cornu-Thenard et al., 1994, realizaron un estudio de casos y controles con sujetos y sus progenitores donde se les interrogaba por los antecedentes de enfermedad venosa y se les examinaba la presencia o no de varices. En este estudio se concluye que el riesgo de desarrollar varices es del 20% si no se tiene a

ninguno de los progenitores afectado, 25-62% si se tiene uno de los progenitores con la enfermedad y del 90% si se tienen ambos progenitores afectados.

Tradicionalmente la actividad prolongada en bipedestación ha sido considerada un factor de riesgo para el desarrollo de varices y ciertamente existe la creencia popular de que estar prolongadamente de pie condiciona su aparición. En su mayoría, esta dolencia la padecen personas de mediana edad que se encuentran en una etapa de actividad profesional, particularmente aquellas en las que su trabajo exige muchas horas de bipedestación, lo que contribuye en buena medida al absentismo laboral y tiene importantes repercusiones sociosanitarias y económicas. Así pues, la ergometría y la actividad física de una ocupación representan un factor epidemiológico clásicamente descrito en la patología venosa. La mayoría de los estudios epidemiológicos, pero no todos, indican que trabajar de pie en una posición de ortostatismo prolongado puede aumentar la prevalencia y severidad de la enfermedad. Estos resultados deben ser interpretados con cautela debido a la dificultad de determinar retrospectivamente por los sujetos de los estudios la postura en el lugar de trabajo, sobre todo después de muchos años después de que dejaran de trabajar. Aunque la bipedestación prolongada puede ser un factor agravante para la enfermedad venosa, es poco probable que pueda ser una causa primaria. Las bases biológicas para considerar el ortostatismo prolongado como factor de riesgo son la estasis venosa y la presión hidrostática incrementada dentro del vaso.

Tabla 2. Estudios epidemiológicos que muestran la asociación entre actividad laboral y presencia de IVC.

AÑO	ESTUDIO	ACTIVIDAD LABORAL	ASOCIACIÓN
1981	Abramson/West Jesusalén	Bipedestación	+
1981	Kakande/Nairobi	Bipedestación	+
1988	Brand/Framingan	Bipedestación/ Sedestación	+
1992	Sadick/Nueva York	Bipedestación	+
1995	Pinto/Italia	Bipedestación	+

1995	Scott/Boston	Bipedestación	+
1995	Sisto/Finlandia	Bipedestación	+
1998	Evans/Edimburgo	Bipedestación/ Sedestación/Caminando	+
1986	Maffei/Brasil	Bipedestación/Sedestación/Caminando	0
1991	Stvrtinova/República Checa	Bipedestación/ Sedestación	0

+ Asociación positiva. 0 No asociación

(Adaptado de Robertson et al., 2008).

El sexo femenino parece ser el más vulnerable a la IVC, aunque existen algunos estudios que muestran mayor prevalencia en hombres (Evans et al., 1999, TE Scott., 1995) o no encuentran diferencias entre ambos sexos (Franks., 1992). Se ha constatado que una de cada dos mujeres presenta problemas venosos en algún momento de su vida y nueve mujeres por cada paciente varón acuden a las consultas de los especialistas. Esto puede estar relacionado con factores hormonales, que contribuyen a la sintomatología. Además, el embarazo aumenta el riesgo de la patología, como demuestra el hecho de que el 50% de las embarazadas padezca edemas y el 30% acaba desarrollando varices, las cuales son directamente proporcionales al número de partos (Robertson et al., 2008). Todos los datos hasta la fecha indican una mayor prevalencia en la mujer, aunque las cifras son heterogéneas.

El embarazo es otro factor que aumenta el riesgo de padecer varices, debido al incremento de la presión abdominal, al aumento del volumen sanguíneo y también relacionado con los cambios hormonales que induce, como la secreción de relaxina y el aumento conjunto de estrógenos y progestágenos (Beebe-Dimmer et al., 2004). El incremento del riesgo de padecer varices aumenta con el número de partos. Así, se ha comprobado que en mujeres con 1, 2, 3, 4 o más partos el riesgo se incrementa en un 32, 38, 43, 48 y 59%, respectivamente (Robertson et al., 2008).

La frecuencia de varices se incrementa con la edad, siendo de aproximadamente el 10% en personas menores de 30 años y del 55% en personas con edades comprendidas entre 55 y 64 años (Bradbury et al., 1999). Esta prevalencia se incrementa de manera lineal (Evans et al., 1999).

Otro factor de riesgo potencialmente descrito es la dieta. Se ha propuesto que una dieta deficiente en fibra era un factor que contribuye al desarrollo de varices (Cleave,1959) debido a que el estreñimiento produce un aumento de presión intraabdominal. El problema de estos estudios es que están realizados en poblaciones caucásicas y sería importante recoger estos datos en otras poblaciones con diferentes hábitos dietéticos.

La actividad física deficitaria conlleva a un aumento de la sintomatología venosa como pesadez de piernas, edema, cambios en la piel y esta clínica disminuye significativamente en la población con actividad física moderada o intensa (Callejas and Manasanch, 2004). Del mismo modo se recoge en este estudio la influencia del índice de masa corporal (IMC). Cuanto mayor es el IMC, mayor es el aumento de la sintomatología pero existe un debate sobre si éste es un factor de riesgo más para la enfermedad venosa varicosa. En varios estudios se demuestra una relación significativa entre el IMC y ser mujer (Evans et al 1998). Estas diferencias de género observadas, junto con el hecho de que las mujeres multíparas tienden a tener mayor peso corporal promedio que las nulíparas, puede ser indicador de que la paridad actúa como factor de confusión en la relación entre obesidad y varices.

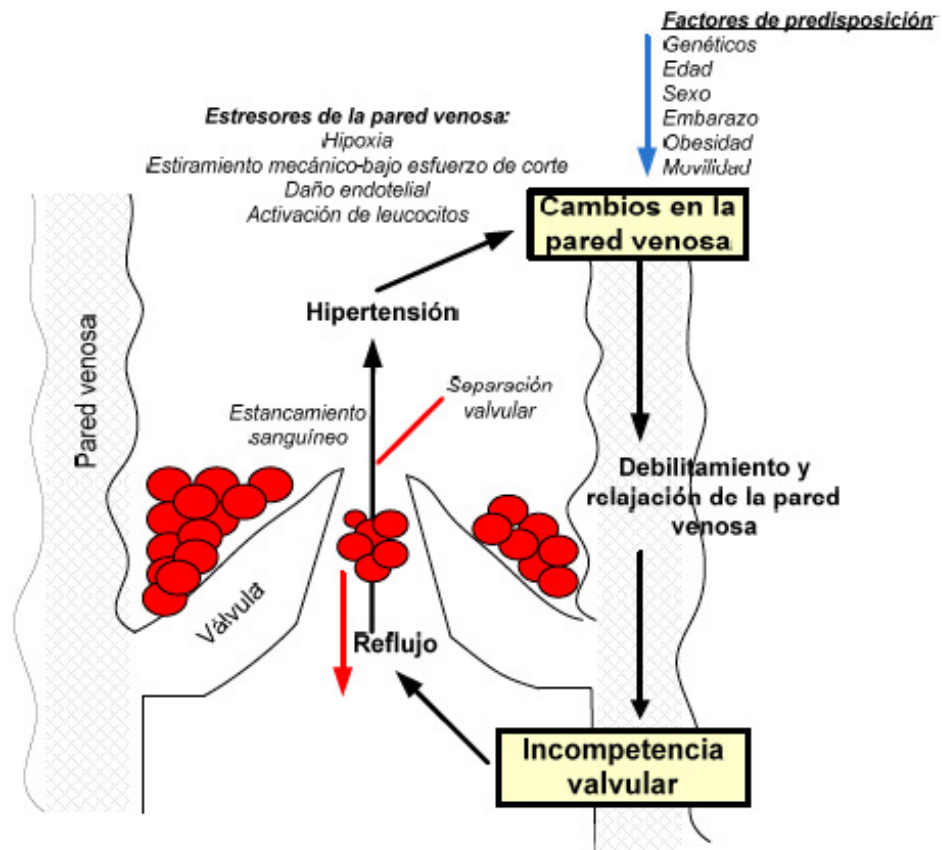


Figura 2. Esquema de los posibles factores de riesgo implicados en la formación de las varices en MMII.

(Adaptado de Lim and Davies, 2009).

4. Etiología de la IVC. Teorías patogénicas.

Una de las hipótesis más aceptadas sobre la etiología de la IVC es la de la *incompetencia valvular primaria*. Los estudios angiológicos demuestran que los pacientes con IVC presentan diversas alteraciones y daños de las válvulas venosas tales como elongación, rigidez, rotura, adelgazamiento, retracción (Van Cleef et al., 1992) e incluso la reducción de su número (Sales et al., 1998), así como hipotrofia y ensanchamiento del anillo valvular (Corcos et al., 1996b, Corcos et al., 1996a,

Corcos et al., 2000). Estas modificaciones a menudo van acompañadas por una reducción en los niveles de colágeno valvular que finalmente se traducen en la pérdida de las propiedades elásticas de las venas (Psaila and Melhuish, 1989). La causa y la secuencia de eventos que dan lugar a este fenómeno no está claro. Inicialmente se sugirió que el daño valvular a nivel de la unión safeno-femoral era el principal evento con fracaso secundario de las válvulas más distales como resultado de una mayor presión. Sin embargo, el hallazgo de daño valvular aislado en sitios distantes a ésta o en afluentes de la VSI contradice esta teoría. Estos cambios valvulares promoverían el estancamiento sanguíneo y la hipertensión venosa. De hecho, la incompetencia de la válvula venosa parece ser crucial en el desarrollo de hipertensión venosa. La estasis de sangre que se produce por el deterioro valvular tiene a su vez repercusiones negativas sobre la pared venosa, debilitándola. La dilatación venosa puede también separar los pliegues endoteliales que forman la válvula y acentuar su incompetencia (Fowkes et al., 2001, Takase et al., 2004). También hay que tener en cuenta la importancia de la disfunción valvular en la progresión y cronificación de la enfermedad. La incompetencia valvular primaria representa un proceso que se desarrolla simultáneamente en varios segmentos venosos discontinuos (Labropoulos et al., 1997), por lo que las válvulas distales pueden llegar a ser incompetentes de forma secundaria al reflujo y a la dilatación proximal, tendiendo a una progresión retrógrada de la enfermedad (Meissner et al., 2007, Naoum and Hunter, 2007, Raffetto and Khalil, 2008a); aunque no siempre se da esta circunstancia.

Otra hipótesis sobre la etiología de la IVC es la *alteración primaria de la pared venosa*. Así pues, múltiples autores han sugerido que esta debilidad de la pared sería el resultado de problemas estructurales en la misma con una serie de anomalías en las proteínas estructurales. Éstas incluyen un colágeno anormal y alteraciones en el contenido de elastina. Sin embargo puede que estos hallazgos sean el resultado y no la causa del desarrollo de las varices. Se han observado numerosos cambios en los componentes celulares y en la matriz extracelular (MEC) de todas las capas de la pared de las venas varicosas (Naoum et al., 2007, Raffetto and Khalil, 2008b, Somers and Knaapen, 2006). Se ha prestado especial atención al estudio de las alteraciones de la MEC ya que ésta juega un papel relevante en la mecánica vascular y sus anomalías. La MEC mantiene la integridad y homeostasis

de la vena a través de sus interacciones con el endotelio y las células musculares lisas (Hobeika et al., 2007), por lo que no es de extrañar que su degradación pueda contribuir al debilitamiento y a la dilatación de la pared venosa.

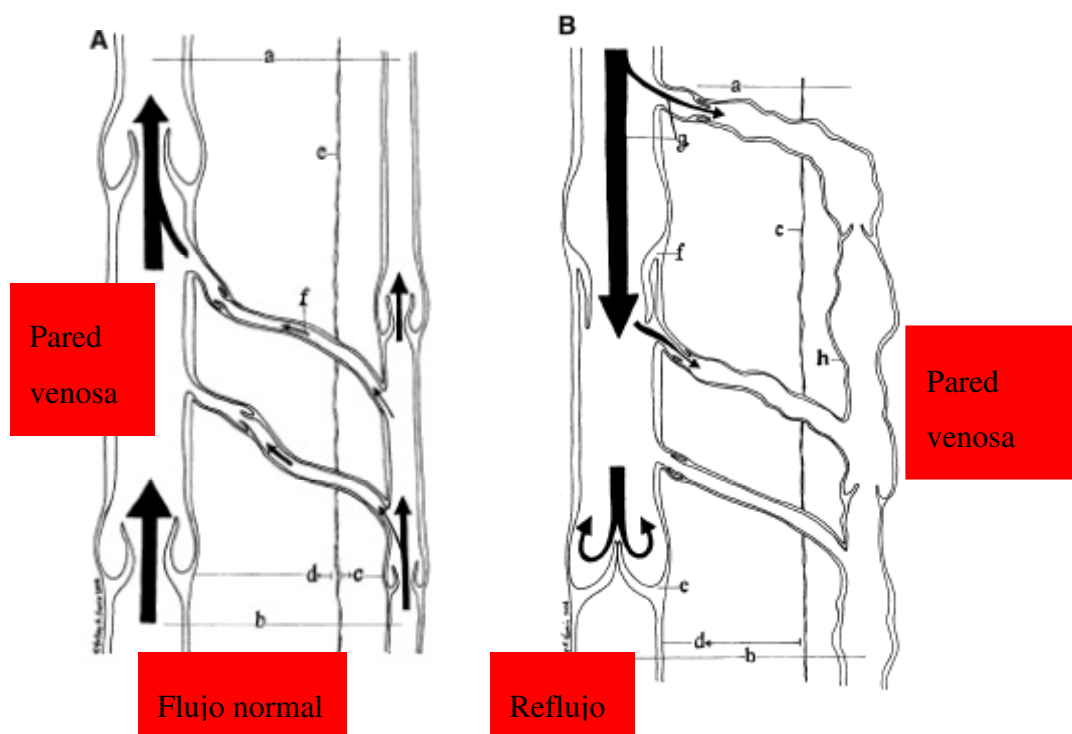


Figura 3. Fisiología del flujo venoso normal y con incompetencia valvular. La foto de la izquierda muestra un esquema representativo de las consecuencias de la dilatación valvular

(Adaptado de Beebe-Dimmer 2005).

Entre otras anomalías se ha observado que las venas varicosas presentan fibras elásticas fragmentadas y fibras individuales de colágeno engrosadas (Wali and Eid, 2002, Porto et al., 2002). Estos cambios afectan el balance entre el contenido de elastina y colágeno que puede contribuir al debilitamiento de la pared venosa (Wali et al., 2003). La homeostasis de la MEC está regulada por un grupo de enzimas

conocidos como metaloproteinasas de matriz (*Matrix Metalloproteinasas*, MMPs) y por sus inhibidores endógenos (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinasas*, TIMPs). Las MMPs son endopeptidasas de la familia de las proteasas conocidas como metzincinas, por ser dependientes de zinc y son capaces de degradar muchos de los constituyentes de la MEC. Las MMPs son reguladas a nivel de traslación y transcripción y pueden ser activadas o inhibidas por proteínas plasmáticas entre ellas las TIMPs. Se han identificado veintitrés MMPs en humanos, de los cuales al menos catorce se expresan en tejido vascular. Las causas de las alteraciones que presenta la MEC aún no están esclarecidas pero por ejemplo estarían las relacionadas con el estancamiento de la sangre y la hipertensión venosa, que producen hipoxia, el estiramiento mecánico, baja fuerza en cizalla, daño endotelial y la activación de leucocitos (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007, Lim et al., 2010).

En relación con las anormalidades de distintos componentes de la pared venosa en la formación de varices se ha encontrado una *expresión alterada de varios genes* asociados con la regulación de la homeostasis de la pared venosa, entre otros aquellos involucrados en la síntesis de la MEC: tubulinas, actinas, colágeno tipo I, versican, actina y tropomiosina (Lee et al., 2005). Algunos estudios han apoyado la teoría de que el inicio en la formación de varices se basa en una regulación a la baja de la expresión génica de la desmulina que se ha observado en las células del músculo liso de las varices. El gen que codifica la desmulina está situado en el cromosoma 15q26.3. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas de filamentos intermedios y se encuentra en las células del músculo liso proporcionándoles resistencia e integridad. Los estudios también sugieren que la regulación a la baja de la desmulina en la pared de la vena puede ser responsable de cambios fenotípicos en la actividad contráctil y por tanto del comportamiento de la pared venosa. Es importante observar que un número de estudios amplio ha demostrado diferencias entre las venas varicosas y normales en la expresión de muchos otros genes, incluyendo los genes estructurales que regulan la MEC, proteínas del citoesqueleto y miofibroblastos. Es importante destacar que aún no está claro si la expresión diferencial de estos genes es una causa o el efecto de las varices.

Otra teoría asociada a las anteriores tendría relación con *el aumento de radicales libres*. Los cambios hemodinámicos se acompañan de estasis de la sangre e hipoxia, lo cual afecta al endotelio y a los tejidos circundantes. Esto crea condiciones favorables para el exceso de radicales libres. Se ha demostrado que las válvulas de las venas safenas de paciente con IVC están infiltradas de monocitos y macrófagos. Esta infiltración es mayor en la cavidad de la válvula y en la pared venosa proximal que en la zona distal, lo cual sugiere que la presión venosa participa en el proceso de infiltrado (Takase et al., 2004b, Takase et al., 2004a). Por otro lado, se sabe que la fuerza en cizalla o esfuerzo de corte (*shear stress*, fuerza por unidad de área ejercida por un fluido en movimiento en la dirección del plano tangente) es bajo o nulo cuando existe un estancamiento sanguíneo y/o el flujo sanguíneo es turbulento (favorecido por la tortuosidad de la pared vascular y el cambio en la dirección del flujo sanguíneo). Todos estos cambios promueven procesos inflamatorios, el incremento de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y la migración de leucocitos (Traub and Berk, 1998, Berk et al., 2001, Hsiai et al., 2001, Passerini et al., 2003). Mediante estudios inmunocitoquímicos y ultraestructurales se ha puesto de manifiesto que los leucocitos, bajo condiciones de presión, se acumulan en las extremidades inferiores, debido a la capacidad de adherirse al endotelio y de migrar a través del mismo (Yong and Khwaja, 1990).

Los niveles de presión que soportan las extremidades inferiores en condiciones de bipedestación favorecen la activación de los leucocitos (Raffetto and Khalil, 2008b). Los leucocitos activados expresan diferentes moléculas de adhesión tales como L-selectina, que es secretada al plasma y la integrina CD11b, que se liga firmemente a la molécula de adhesión intracelular (*Intercellular Adhesion Molecule-1*; ICAM-1) por lo que pueden adherirse al endotelio y posteriormente migrar a través de él (Yong and Khwaja, 1990). Se ha observado que la hipertensión venosa inducida por 30 minutos de bipedestación en pacientes con IVC produce varias alteraciones relacionadas con moléculas de adhesión en el plasma (Saharay et al., 1998). Se produce la reducción de los niveles de L-selectina e integrinas en los neutrófilos y los monocitos circulantes como consecuencia de su retención en la pared venosa durante la microcirculación; al tiempo que se incrementan los niveles plasmáticos de L-selectina, lo cual refleja la liberación de estas moléculas durante la

adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. Incluso, en pacientes con IVC, estas moléculas de adhesión se producen por el simple hecho de caminar, presumiblemente en respuesta al incremento de la presión hidrodinámica que se transmite a través de las venas perforantes incompetentes y los vasos cutáneos y subcutáneos (Ciuffetti et al., 1999).

Los leucocitos activados son capaces de producir importantes cantidades de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y proteasas que degradan la MEC (Michiels et al., 2002). Asimismo pueden liberar distintos factores de crecimiento, como el bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) y el PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) que pueden inducir la proliferación, la migración y la desdiferenciación de las células musculares lisas, lo que contribuye al remodelado de la pared venosa (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007).

Por otro lado, las células endoteliales cumplen un papel importante en la regulación de la inflamación, del remodelado y del tono vascular en la insuficiencia venosa. Estas células suelen estar deformadas (Aunapuu and Arend, 2005) y activadas (Michiels et al., 2002) y son capaces de liberar distintos tipos de mediadores inflamatorios como moléculas de adhesión, factor de von Willebrand, factores de crecimiento (Aunapuu and Arend, 2005) y sustancias vasoactivas. Se ha determinado en algunos estudios además (Glowinski and Glowinski, 2002), que el potencial antioxidante está disminuido en las venas varicosas. La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) está disminuida y esto conlleva a un aumento de productos derivados de la peroxidación de lípidos. Además este estudio y otros (Condezo et al., 2013) muestran un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes. Posiblemente esto indique que el trastorno bioquímico en la pared venosa sea el primer paso en la patogénesis de las venas varicosas y la dilatación de las mismas una consecuencia hemodinámica.

Como se desprende de lo anteriormente expuesto, el funcionamiento normal del sistema venoso depende de la integridad de las válvulas, de la pared venosa y de la hemodinámica del flujo sanguíneo venoso. Estos tres componentes están interrelacionados y las venas varicosas presentan clínicamente alteraciones en todos ellos. Esto hace difícil establecer la secuencia de los eventos patológicos, lo que sumado a la etiología multifactorial de la enfermedad complica aún más el

entendimiento del proceso de formación de las varices.

5. Clasificación de la IVC.

Tradicionalmente la clasificación de la IVC se realizó exclusivamente basándose en la apariencia de las venas varicosas. En el papiro de Ebers (1550), ya se definen las várices como “hinchazones sinuosas y serpentiformes con numerosos nudos” (Pocard, 1997). Antes de la década de los sesenta, las descripciones eran declaraciones anecdóticas del problema basadas en experiencias de muestras hospitalarias. Posteriormente, en las décadas de los sesenta y setenta, Denis Parsons Burkitt (1956) con sus observaciones en el África ecuatorial, estimuló la realización de estudios epidemiológicos por observaciones clínicas (Burkitt, 1972). Hasta la década de los ochenta se concentraban en definir un criterio estándar para venas varicosas y en describir su frecuencia de presentación y la mayoría de los estudios acogieron la definición dada por Arnoldi (1957): “cualquier vena subcutánea dilatada, tortuosa o elongada en las extremidades inferiores”. Luego, algunos autores, adoptaron los criterios del estudio Basle, el cual clasificaba las várices mediante el examen físico en várices tronculares, reticulares y telangiectasias (Widmer, 1978). En la década del noventa se publicó el estudio venoso de Edimburgo, el cual clasificó las venas de acuerdo a su severidad de daño en: tronculares, reticulares y varices intradérmicas, las que posteriormente pasaron a ser simplemente “venas varicosas (> 4 mm), venas reticulares (<4 mm) y telangiectasias (<1 mm) (Porter et Moneta, 1995). Los estudios se concentraban más en la presencia de enfermedad, que en el simple hallazgo visual de las venas y se acordó la definición de insuficiencia venosa crónica para “todos los desórdenes venosos que no son agudos”, es decir, se excluye entonces, la trombosis, oclusión o trauma. También se llegó al acuerdo en definir a la enfermedad venosa como aquella que “causa síntomas en los miembros inferiores incluyendo edema, hiperpigmentación, lipodermatoesclerosis y ulceración”, la cual por definición excluía las telangiectasias asintomáticas.

Con el advenimiento de las técnicas no invasivas como el eco-doppler color, los estudios empezaron a basarse en los hallazgos funcionales, además de evaluar el hallazgo físico. La ausencia de precisión en el diagnóstico, los informes controvertidos en el manejo de los problemas venosos específicos (consecuencia de

la falta de claridad diagnóstica y de una clasificación que permitiera comparar estudios) llevó en 1994 a un comité internacional, del Foro Venoso Americano, a definir y clasificar los desórdenes venosos. Este consenso permitió clasificar la enfermedad venosa en cuatro categorías: clínica (C), etiología (E), anatomía(A) y patofisiología (P). Tras un año de trabajo se llegó a la clasificación que se utiliza hoy en día y cuya denominación es C.E.A.P (clinical-etilogic-anatomicpathophysilogic). En el año 2004, se realizó la primera revisión de la clasificación CEAP (Eklöf et al., 2004), la cual refinó algunas definiciones, adicionó el descriptor C0 de “NO anormalidad venosa identificada”, incorporó el dato de clasificación y el nivel de investigación del problema venoso y describió una clasificación CEAP como alternativa más simple a la clasificación completa que ahora quedó como “avanzada”. Desde entonces, los estudios de prevalencia deberían emplear la clasificación CEAP descriptiva, mientras que los estudios experimentales de intervención, deben emplear el índice de severidad venosa de la clasificación CEAP que incluye número de segmentos anatómicos afectados, grado de severidad de los síntomas y signos y discapacidad.

Basándose en los criterios arriba mencionados de la IVC se determina por: 1) el número de segmentos anatómicos afectados, 2) el grado de severidad de los síntomas y 3) la discapacidad que le supone al paciente.

Los pacientes con IVC se clasifican en:

1. Clínico (C).

C0 Sin signos ni síntomas evidentes de enfermedad venosa

C1 Telangiectasias o venas reticulares

C2 Varices colaterales o tronculares

C3 Venas varicosas con edema

C4 Varices con cambios cutáneos tróficos de éstasis venosa (dermatitis ocre, lipodermatoesclerosis o eczema entre otros)

C5 Venas varicosas con úlcera cerrada

C6 Venas varicosas con úlcera abierta

2. Etiológico (E).

Ec Congénita

Ep Primaria

Es Secundaria a etiología conocida (postraumática o postflebítica).

3. Anatómica (A)

As Vena del sistema venoso superficial

Ad Vena del sistema venoso profundo

Ap Vena del sistema venoso perforante

4. Fisiopatológica (P)

Pr Reflujo

Po Obstrucción

6. Estudio eco-doppler.

El eco-doppler es la exploración no invasiva que, en el momento actual aporta la mayor información sobre la patología que nos ocupa. La utilización del eco-doppler en el estudio de la insuficiencia venosa es el único procedimiento no invasivo capaz de suministrar una topografía anatómica y hemodinámica precisa de la circulación venosa de los MMII a tiempo real, mostrando “in vivo” los cambios que se producen ante diferentes maniobras que simulan el comportamiento fisiológico de la circulación venosa. El eco-doppler permite una adecuada exploración de las venas del sistema profundo y superficial. Las venas superficiales a explorar comprenderán ambas venas safenas y sus ramas, así como las venas perforantes. Para ello se utilizará un transductor de 7.5-10 Mhz con doppler pulsado. El complemento del doppler color puede ser útil, si bien no resulta indispensable. Fundamentalmente se practicarán secciones transversales en sentido descendente efectuando una reconstrucción tridimensional de los vasos estudiados.

Las maniobras efectuadas en el diagnóstico de la insuficiencia venosa crónica son: la maniobra de Valsalva, la cual al producir un paro circulatorio proximal

permitirá la exploración de la insuficiencia venosa proximal al punto de detección, así como la identificación de los puntos de fuga.



Figura 4. Ecógrafo utilizado en este estudio.

La maniobra de compresión y descompresión distal permitirá valorar la dirección de flujo venosa troncular, no siendo sin embargo una maniobra fisiológica.

De especial importancia son las maniobras de exploración de bomba muscular punta-talón y Paraná por cuanto nos permitirán valorar la eventual insuficiencia venosa en condiciones fisiológicas.

En función a la relación anatómica de los componentes vasculares con las distintas estructuras de los MMII (relación con las fascias) podremos distinguir 4 redes venosas:

- Red primaria, comprende aquellas venas situadas en un plano profundo a la fascia profunda, correspondería al sistema venoso profundo.

- Red secundaria, comprende aquellas venas situadas en el interior de la fascia de desdoblamiento, corresponderían a la safena interna, safena anterior o accesoria, safena externa y vena de Giacomini.

- Red terciaria, comprenden aquellas venas situadas por fuera de la fascia de desdoblamiento, corresponderían fundamentalmente a ramas de las safenas, o a venas originadas por perforantes. Dichas venas terminan en perforantes o conectan con las venas safenas.

- Red cuaternaria, sería un tipo especial de red terciaria que conectaría a dos segmentos de safena entre sí. Pueden ser de 2 tipos: longitudinal cuando conectan a la misma safena o transversal cuando conectan a otro elemento de la red secundaria.

Uno de los aspectos más importantes que sin duda aporta el eco-doppler en el estudio de la insuficiencia venosa consiste en la posibilidad de realizar una cartografía no sólo morfológica, sino también hemodinámica, de las venas estudiadas. Antes de referirnos a ella es necesario considerar algunos conceptos previos.

Entendemos por flujo anterógrado el sentido de flujo fisiológico de una vena. Flujo retrógrado sería aquél flujo de sentido contrario al fisiológico. Punto de fuga sería el paso de un compartimento interior a otro exterior. Punto de entrada sería el paso de un compartimento exterior a otro interior. El reflujo ha sido ya definido como un flujo que regresa en sentido contrario al fisiológico, presupone un flujo previo de sentido normal. El concepto de reflujo es un concepto caracterizado por la presencia de flujo bidireccional, no aportando información acerca de su punto de origen.

El concepto de competencia o incompetencia venosa hace referencia a la función valvular, no presuponiendo necesariamente el sentido de flujo. Podemos concebir el síndrome de insuficiencia venosa superficial como un circuito retrógrado o shunt veno-venoso. Éste viene determinado por un punto de fuga (por ejemplo la unión safeno-femoral), un trayecto habitualmente retrógrado, cuya parte visible constituirían las varices y finalmente un punto de re-entrada al sistema venoso profundo (a través de venas perforantes). El desplazamiento de la sangre en el shunt veno-venoso está condicionado por la energía gravitatoria de la columna de presión y por la propia energía cinética generada por la bomba muscular. En relación

a la bomba muscular un shunt puede activarse en sístole, o más frecuentemente en diástole. A su vez un shunt puede ser cerrado o abierto, según la sangre recircule o no en el interior del mismo.

7. Tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.

El tratamiento de la patología varicosa tiene múltiples vías de abordaje y se determina mediante el examen clínico seguido por un estudio ecográfico y doppler del sistema venoso de las extremidades inferiores. Existe una amplia variedad de terapias disponibles para tratar varices, incluidas las terapias conservadoras y las intervenciones quirúrgicas. Se recomienda terapias conservadoras con frecuencia en asintomáticos o aquellos pacientes con síntomas leves a moderados. Las intervenciones quirúrgicas generalmente son necesarias cuando los síntomas de las venas varicosas afectan significativamente en la calidad de vida del paciente. Siempre que el sistema venoso profundo de las piernas sea competente y libre de obstáculos, un paciente puede tolerar con seguridad la extirpación quirúrgica o la oclusión de las venas varicosas. La terapia conservadora intenta limitar la progresión de la enfermedad. Se aconseja cambios en el estilo de vida, incluyendo el ejercicio físico y la pérdida de peso así como las medias de compresión para aliviar la sintomatología y evitar las complicaciones de las varices.

7.1. Cirugía.

El efecto beneficioso inducido por la cirugía del sistema venoso superficial depende del grado del avance de la insuficiencia venosa. La cirugía del sistema venoso superficial puede producir efectos significativos en la hemodinámica venosa general, de hecho algunos segmentos venosos, tales como las venas perforantes y venas profundas, pueden invertir su incompetencia como consecuencia de la reducción en la sobrecarga venosa total de la pierna.

La escleroterapia se realiza generalmente como paciente ambulatorio y el procedimiento se realiza con anestesia local. Esta técnica implica la inyección de una sustancia química líquida (esclerosante) en la vena anormal para iniciar la

inflamación y oclusión, guiada por ultrasonido la escleroterapia permite que el esclerosante pueda ser inyectado directamente. La escleroterapia con espuma (mezcla el aire o el gas con el esclerosante) para producir espuma, lo que permite que una pequeña cantidad de esclerosante pueda cubrir un área superficial mayor por desplazamiento de la sangre dentro de la vena.

La flebectomía ambulatoria consiste en extraer venas varicosas distales a la unión safeno-femoral o a la unión safeno-poplítea, sin incluir la safena interna ni externa. Con anestesia local, se hacen pequeñas incisiones en la piel y las varices de gran superficie se extraen utilizando un gancho de flebectomía.

La ligadura con o sin extirpación venosa es generalmente apropiada cuando la VSI y VSE tienen reflujo o incompetencia que se demuestra en un eco-doppler. Esta intervención se realiza generalmente como un procedimiento con el paciente hospitalizado bajo anestesia general.

Existen dos tratamientos endovenosos, la radiofrecuencia y la terapia con láser endovenoso. En ambos tratamientos se utiliza una fuente térmica tipo catéter que se introduce por la vena a tratar justo distal a la unión con el sistema venoso profundo. El calor que genera el catéter se va retirando progresivamente a lo largo del trayecto de la vena a tratar produciendo un daño endotelial y la pared venosa se contrae quedando sellada sin flujo.

Los estudios clínicos han permitido establecer que los cambios inducidos por la cirugía primaria en el reflujo de venas superficiales, perforantes y partes remanentes de VSI es un proceso dinámico. Así, en un número importante de pacientes con venas perforantes incompetentes, la cirugía primaria superficial revierte la anomalía a lo largo de 2 a 24 meses. Por tanto, no existe la necesidad de interrumpir el flujo a través de las venas perforantes, algunas veces recomendado para prevenir la recidiva varicosa (Stuart et al., 1998, Mendes et al., 2003, Rutherford et al., 2001). Se especula que el mecanismo por el cual la cirugía venosa superficial ejerce un efecto beneficioso sobre las venas perforantes incompetentes guarda relación con el periodo de adaptación requerida por los elementos elásticos de la pared venosa una vez reducido el volumen sanguíneo venoso (Turton et al., 1999). Sin embargo, este efecto beneficioso duradero de la cirugía venosa superficial puede ser parcialmente contrarrestado por la formación de nuevos vasos

incompetentes producidos por el re-direccionamiento del flujo venoso después de la remoción de la VSI. Las venas con la pared debilitada que reciben más flujo sanguíneo pos-operatorio pueden llegar a dilatarse y transformarse en varicosas (Turton et al., 1999). De ahí que, la recurrencia, cuya etiología se desconoce, no se puede prevenir totalmente por la mejora de las técnicas de cirugía (Blomgren et al., 2005).

7.2. Tratamiento farmacológico de la IVC.

El tratamiento farmacológico tiene un efecto limitado; sólo está indicado como tratamiento paliativo en ciclos temporales de duración limitada, no existiendo evidencia de utilidad en el empleo sistemático y sostenido. La Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular estima oportuno realizar las siguientes precisiones: la resolución de la Agencia Española del Medicamento, tras una reevaluación de la relación beneficio-riesgo de los agentes flebotónicos para la administración por vía oral, concreta la indicación terapéutica de los mismos únicamente para un alivio a corto plazo (de 2 a 3 meses) del edema y síntomas relacionados con la IVC, recomendación que el capítulo sobre flebología de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular comparte absolutamente.

Tabla 3. Esquema sobre la evidencia científica y las recomendaciones en el tratamiento médico de la IVC.

EVIDENCIA / RECOMENDACIÓN	NIVEL/GRADO
<p>E</p> <p>No hay pruebas suficientes para apoyar en forma global la eficacia de los flebotónicos para la IVC. Se ha sugerido que los flebotónicos tienen cierta eficacia sobre el edema pero su relevancia clínica es incierta. Debido a las limitaciones de la evidencia actual, hacen falta más ensayos clínicos controlados y aleatorizados que tengan mayor consideración a la calidad metodológica.</p>	<p>Ia</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Martínez MJ et al, 2008</p>

<p>E</p> <p>Las drogas flebotónicas parecen ser una estrategia terapéutica adecuada para los pacientes que no son candidatos para la cirugía, es decir, aquellos en los que la cirugía está contraindicada o como una terapia coadyuvante en los pacientes elegibles para cirugía.</p>	<p>III</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Agus GB et al, 2005</p>
<p>R</p> <p>Aunque la evidencia no es suficiente para apoyar el uso de flebotónicos, pueden utilizarse en los siguientes casos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -manejo de síntomas subjetivos y funcionales de IVC. -pacientes con IVC en donde la cirugía no está indicada. -como terapia coadyuvante en pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico con persistencia de síntomas subjetivos. <p>Se recomienda considerar que el tratamiento farmacológico no sustituye a la compresoterapia.</p>	<p>A</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Martínez MJ et al, 2008</p> <p>Agus GB et al, 2005</p>
<p>E</p> <p>No hay suficiente evidencia sobre la utilización de diuréticos como parte del tratamiento médico de la IVC.</p>	<p>III</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Jones R et al, 2008</p>
<p>E</p> <p>La pentoxifilina ha demostrado efectividad en la cicatrización de la úlcera venosa, es un complemento efectivo de la terapia de compresión para el manejo de esta patología.</p>	<p>Ia</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Jull A, 2008</p>
<p>R</p> <p>Se recomienda utilizar pentoxifilina en pacientes con úlcera venosa. No está justificado su uso en pacientes con clasificación (C) de CEAP menor de 6.</p>	<p>A</p> <p>(E:Shekelle)</p> <p>Jull A, 2008</p>

Entre los fármacos flebotónicos se encuentran los flavonoides y derivados de los extractos del castaño de indias. Diversos ensayos clínicos han demostrado que estas sustancias parecen mejorar los síntomas de la IVC (Martinez et al., 2005, Struckmann, 1999). Aunque su mecanismo de acción no está totalmente esclarecido se sabe que, incrementan el tono venoso, reducen la inflamación de la pared y reducen la permeabilidad capilar (Martinez et al., 2005). Se ha sugerido que los flavonoides pueden proteger la pared vascular de la hipoxia e inhibir la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y los leucocitos (MacKay, 2001, Nicolaidis, 2003). Por otra parte, los extractos del castaño de indias, que contienen el compuesto triterpénico saponina, poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (MacKay, 2001). Otro compuesto que parece ser efectivo en la sintomatología de la IVC es el pycnogenol (Horpag Research, Ginebra, Suiza). Este compuesto, extraído de la corteza de una planta marítima, tiene propiedades antiinflamatorias al inhibir la expresión de la 5-lipoxigenasa y la ciclooxigenasa-2 y al reducir la actividad de la fosfolipasa A2 (Canali et al., 2009). El mecanismo de acción de estos y otros compuestos similares parece estar relacionado con su capacidad de reducir la inflamación de la pared venosa y el remodelado que sigue a la hipoxia, el estrés mecánico y la reducción del estrés de corte (Lim and Davies, 2009).

Otro grupo de compuestos potencialmente interesantes son los que restauran la homeostasis de la MEC, por ejemplo los moduladores de MMPs y TIMPs. Los inhibidores de las MMPs, como las estatinas o la doxiciclina, han demostrado reducir la degradación de la pared arterial en aneurismas (Abdul-Hussien et al., 2009), por lo que existe la posibilidad de que ejerzan un efecto similar en la pared de venas varicosas.

B. ESTRÉS OXIDATIVO

Tradicionalmente el estrés oxidativo se definía como una situación de desequilibrio global entre pro-oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros (Sies, 1985). Actualmente el estrés oxidativo se considera una alteración de la señalización y el control redox (Jones, 2006), ya que, en condiciones fisiológicas normales, los pro-oxidantes o especies reactivas se producen en el metabolismo celular normal y tienen un papel biológico entre otros en la defensa contra infecciones o actúan de moléculas de señalización. El delicado balance entre los efectos beneficiosos o dañinos de los radicales libres es de vital importancia para los organismos y a este mecanismo se lo conoce como “regulación redox u homeostasis redox” (Dröge, 2002).

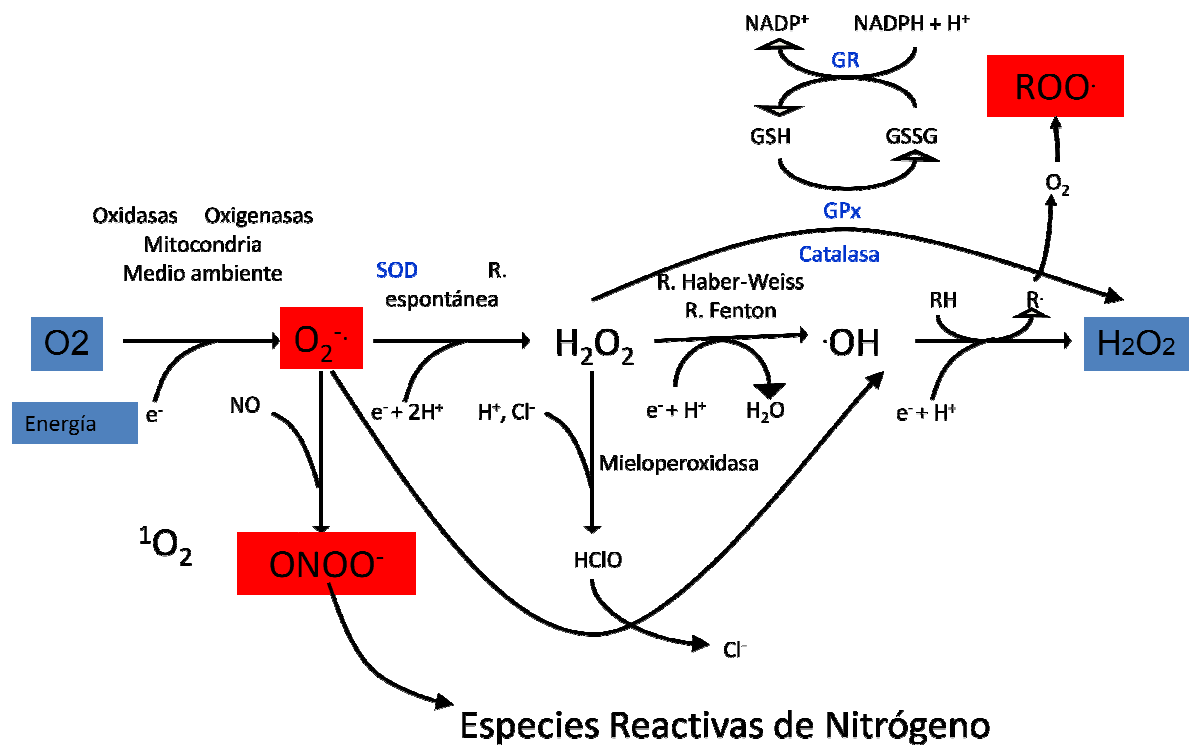


Figura 5. Esquema sobre las reacciones de formación y eliminación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno además de los sistemas de defensa antioxidante.

(Adaptado de Valko et al., 2007).

1. Radicales libres (RL).

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que se produce pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno. A su vez toda reacción de oxidación conlleva otra de reducción en la cual se captan electrones. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. El oxígeno es la principal fuente de energía en los organismos aerobios. La mayor parte del oxígeno se reduce a agua pero un 2% puede dar lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS). Los radicales libres (RL) son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares lo que les confiere una alta reactividad (Halliwell and Gutteridge, 1999). Los radicales derivados de oxígeno (ROS) representan la clase más importante en los sistemas biológicos (Miller et al., 1990). Los ROS se generan mediante sucesivas reacciones de reducción, el oxígeno se reduce a radical anión superóxido, éste a su vez puede reducirse a peróxido de hidrógeno y el peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo. Otros radicales libres de importancia biológica son los radicales libres derivados del nitrógeno (especies reactivas del nitrógeno, RNS) entre ellos el óxido nítrico.

Tanto los ROS como los RNS tienen un papel dual dentro de un sistema biológico. La superproducción de estas especies reactivas se traduce en un proceso dañino sobre las estructuras celulares, lo que se la denominado estrés oxidativo. Dentro de la patología vascular, el endotelio representa el elemento central en el control de la homeostasis vascular.

La reactividad química de los radicales libres se puede evaluar mediante un parámetro denominado vida media ($t_{1/2}$). Los radicales de mayor reactividad son los que tienen una vida media más corta. Existen otras especies como veremos posteriormente con elevada reactividad, y no son radicales libres, como el peroxinitrito (ONOO^-).

A continuación describimos los ROS y RNS más importantes en los sistemas biológicos.

1.1 Radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$).

El oxígeno molecular tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo un radical. La adición de un electrón a la forma dioxigenada produce el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual es considerado como un ROS primario, es decir a partir del cual se generan otros ROS, ya sea por interacción directa con otras moléculas o mediante procesos catalizados por metales o enzimas (Valko et al., 2005). La producción de $O_2^{\bullet-}$ tiene lugar fundamentalmente en las mitocondrias de la célula relacionado con el funcionamiento de la cadena respiratoria (Cadenas and Sies, 1998). Se estima que durante la transducción de la energía se produce la fuga de una pequeña cantidad de electrones, aproximadamente del 1-3%, que interaccionan con el oxígeno molecular y forman $O_2^{\bullet-}$.

1.2. El radical hidroxilo ($\bullet OH$).

Es la forma neutra del ión hidróxido y posee una elevada reactividad, convirtiéndolo en un radical peligroso. Tiene una vida media muy corta 10^{-9} s *in vivo* (Pastor et al., 2000), de modo que suele reaccionar en el mismo sitio de formación. Parte del estado redox de una célula es regulado por el hierro y cobre que contiene, mantenido el estado redox dentro de estrictos límites fisiológicos. Bajo condiciones de estrés, un exceso de $O_2^{\bullet-}$ favorece la liberación de hierro de las moléculas que lo contienen y su posterior participación en la reacción de Fenton que genera $\bullet OH$ ($Fe^{+2} \xrightarrow{\quad} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^-$) (Valko et al., 2005). El $O_2^{\bullet-}$ puede también participar en la reacción de Haber-Weiss $\xrightarrow{\quad} (O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-)$, la cual combina una reacción de Fenton con la reducción de Fe^{+3} mediante el $O_2^{\bullet-}$ (Liochev and Fridovich, 2002). Aunque se sabe que la reacción de Fenton ocurre *in vitro*, se ha esclarecido en parte su relevancia en condiciones fisiológicas, debido a que la cantidad de hierro libre catalítico puede ser alta en algunas circunstancias (Bunda et al., 2005).

1.3. Radical peroxilo ($ROO\bullet$).

El radical hidroperoxilo ($HOO\bullet$), una forma protonada de $O_2^{\bullet-}$, es la forma

más simple de radical peroxilo pero que debido al valor pKa del $O_2^{\bullet-}$ solo se forma en un 0.3% en condiciones fisiológicas (De Grey, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que HOO^{\bullet} inicia la peroxidación de ácidos grasos por rutas paralelas: una independiente y otra dependiente de hidroperóxidos de ácidos grasos (LOOH) (Aikensand Dix, 1991), siendo esta última un mecanismo relevante de iniciación de la peroxidación de lípidos *in vivo*.

1.4 Óxido nítrico (NO^{\bullet}).

Diversas óxido nítrico sintetas (*Nitric Oxide Sintetases*, NOSs) se encargan de su generación, las cuales metabolizan la arginina a citrulina con formación de NO^{\bullet} mediante una reacción de oxidación en la que participan cinco electrones.

El NO^{\bullet} participa como molécula de señalización en muchos procesos biológicos tales como neurotransmisión, presión arterial, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmune (Bergendi et al., 1999). El NO^{\bullet} en medio acuoso, tiene una vida media de pocos segundos, pero es estable abajas concentraciones de oxígeno (vida media >15 s). Asimismo, dado su solubilidad en medio acuoso y lipídico difunde con facilidad a través de la membrana citoplasmática.

La molécula de nitrógeno está formada por dos átomos de nitrógeno que forman tres enlaces covalentes completos, lo que le hace una molécula estable e inerte. Cuando un átomo de nitrógeno con tres electrones desapareados, reacciona con un átomo de oxígeno con dos electrones desapareados, se produce óxido nítrico (NO^{\bullet}), que es una molécula con un número impar de electrones ya que se forma un doble enlace completo $N=O$ y queda un electrón desapareado y deslocalizado que es el que da el carácter de radical libre al óxido nítrico. Por tanto, el óxido nítrico es un radical libre desde el punto de vista físico por poseer un electrón desapareado, pero su carácter de radical libre químico, como inductor de reacciones de propagación, no se conoce por el momento. Sin embargo el óxido nítrico puede reaccionar fácilmente con el radical anión superóxido para formar peroxinitritos ($ONOO^-$).

1.5. Anión peroxinitrito (ONOO⁻).

Las células del sistema inmune producen simultáneamente NO[•] y O₂^{•-} durante el proceso oxidativo inducido por la inflamación. Bajo estas condiciones, estos radicales pueden reaccionar entre sí a alta velocidad ($7.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y producir anión peroxinitrito (NO[•] y O₂^{•-} → ONOO⁻), una molécula mucho más oxidante. Los peroxinitritos intervienen en el daño oxidativo generando productos tóxicos como el 4-hidroxinonenal por peroxidación lipídica, la oxidación de los grupos carbonilos de las proteínas y la nitración de los residuos tirosina de las proteínas (3-nitrotirosina, 3-NT), particularmente nocivos para las células. Aunque el peroxinitrito es un fuerte radical libre oxidante, reacciona a una velocidad relativamente lenta con la mayoría de las moléculas. Es capaz de atravesar las membranas celulares, en parte, a través de canales de aniones. De modo que, la toxicidad del NO[•] está relacionada con su capacidad para reaccionar con O₂^{•-}.

1.6. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Las principales especies reactivas de oxígeno son el radical anión superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (•OH). El H₂O₂ no es un radical libre ya que todos sus orbitales contienen dos electrones con spins antiparalelos, pero cae en esta categoría por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los RL. En condiciones biológicas es un oxidante débil que puede oxidar grupos tiol de proteínas o grupos acilo poliinsaturados en lípidos. En la reacción de Fenton puede generar •OH un radical más reactivo.

El peróxido de hidrógeno también puede formarse por la reducción divalente del oxígeno molecular sin la formación del radical anión superóxido mediante las oxidasas de los peroxisomas, enzimas que actúan como catalizadoras de la reacción. Los niveles de concentración de peróxido de hidrógeno en las células suelen ser 1000 veces mayores que los del radical anión superóxido. El peróxido de hidrógeno puede actuar como oxidante o como reductor, y es poco reactivo en disolución acuosa. Sin embargo, en exceso resulta muy nocivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas e inducir la formación del radical hidroxilo

en puntos alejados de su lugar de origen.

2. Sistemas enzimáticos productores de ROS / RNS.

En las células las mitocondrias son la fuente biológica más importante de generación de ROS pero éstos también se generan en la membrana, en el retículo endoplásmico y en el citoplasma. En la pared vascular tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos eran la fuente principal de ROS. Sin embargo, aunque no hay duda de que estas células juegan un papel importante (Cathcart, 2004), está claramente establecido que todas las células de la pared vascular (endotelio, células musculares lisas y células de la adventicia) producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling et al., 2000). Los sistemas enzimáticos principales que generan anión superóxido y sus derivados en la pared vascular son la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la NOS y la mieloperoxidasa. Asimismo, otros sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa hemoxigenasa y el citocromo P-450 pueden generar ROS. Finalmente, también puede producirse ROS por la cadena de transporte electrónico mitocondrial y salida al citoplasma (Touyz, 2005). La importancia relativa de cada uno de estos sistemas va a depender del estado fisiológico o patológico de la pared vascular.

2.1. NADPH oxidasa.

Es una familia de enzimas la cual es principalmente generadora de radicales anión superóxido. El complejo NADH/NADPH oxidasa se encuentra unido a la membrana de las células endoteliales, CML y fibroblastos (Touyz et al., 2002, Lassegue and Clempus, 2003). Este complejo cataliza la reducción del oxígeno molecular usando NADPH como donante de electrones y generando radical anión superóxido. Esta enzima es una proteína multimérica con varias subunidades. La subunidad catalítica que transfiere los electrones es la gp91phox, la Nox1 o la Nox4. La p22phox es una subunidad estabilizadora que une la subunidad catalítica a la membrana plasmática, y las p47phox, p67phox y rac1, son subunidades reguladoras. El patrón de expresión de las diversas subunidades varía según las distintas células de la pared vascular y según el calibre de los vasos. En las células

musculares lisas la Nox1, o la Nox4 es la subunidad catalítica de la enzima, a diferencia de la NADPH oxidasa de neutrófilos, en la que la subunidad catalítica es gp91phox (Hanna et al., 2004).

La NADPH oxidasa de células fagocíticas, que se activa sólo mediante estimulación, produce radical anión superóxido al espacio extracelular en forma de estallido respiratorio (Babior et al., 2002). A diferencia de este patrón de activación, las enzimas de la pared vascular están activadas de forma constitutiva, produciendo radical anión superóxido intracelularmente de forma lenta y sostenida, de manera que puede servir como molécula de señalización (Touyz et al., 2002, Touyz, 2005).

Aunque las NADPH oxidasas vasculares son enzimas constitutivas, se ha demostrado que varios factores humorales, como la Angiotensina II, la Endotelina-1 o el factor de necrosis tumoral (TNF- α) regulan su actividad.

2.2. Xantina oxidasa.

Otra enzima productora de radical anión superóxido en la pared vascular es la xantina oxidoreductasa. Este enzima es ubicuo y existe en dos formas interconvertibles, pero con diferente función: la xantina deshidrogenada (XDH; EC 1.1.1.204) y la xantina oxidasa (XO; 1.1.3.22) (Harrison, 2002). Granger y colaboradores demostraron que esta enzima puede participar en la patogénesis de la isquemia-reperfusión (Harrison, 2002). Durante la isquemia se produce una elevación de calcio que genera xantina oxidasa a partir de la xantina deshidrogenasa, (que predomina en circunstancias normales in vivo). Simultáneamente se genera hipoxantina a partir de ATP. Durante la reperfusión la entrada de oxígeno permite la oxidación de la hipoxantina a xantina por la XO para formar radical anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Cai and Harrison, 2000).

2.3. Mieloperoxidasa.

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima que genera ácido hipocloroso (HClO) y otras moléculas derivadas a partir de peróxido de hidrógeno. Se almacena en neutrófilos y monocitos. Evidencias recientes indican que es una de las

responsables del daño a la pared vascular en aterosclerosis (Bonomini et al., 2008). También se ha descrito un incremento en el contenido de mieloperoxidasa en venas varicosas, sugiriendo que podría tener un papel en las primeras etapas de la formación de venas varicosas mediante la generación de radicales libres (Glowinski and Glowinski, 2002).

2.4. Sintasa de óxido nítrico.

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima sintasa de NO• (NOS) en dos pasos. La NOS forma parte de la familia de las hemoproteínas. Estas enzimas tienen dos dominios distintos cada uno con un papel catalítico específico. Se han descrito tres isoformas de la NOS (NOS I, II y III), también denominadas nNOS, iNOS y eNOS, respectivamente. La nNOS y la eNOS (neuronal y endotelial) son NOS constitutivas y la iNOS es una enzima inducible que requiere el estímulo por lipopolisacáridos o por citocinas, induciéndose su síntesis como un mecanismo de respuesta citotóxica. Las tres isoformas son inhibidas, de manera competitiva, por análogos de la L-arginina, como la NG-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) (Moncada and Palmer, 1991).

La eNOS participa en el control del tono vascular y en el control de la presión arterial y es también una fuente de ROS. Una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o en alguno de los cofactores del enzima, como la BH₄, está asociada con un desacoplamiento de la vía, lo que produce una reducción de la cantidad de NO• y un aumento de la presencia de radicales anión superóxido y peroxinitrito (Landmesser et al., 2003). Esto mismo es lo que podría pasar en la pared de las venas varicosas, ya que se ha encontrado una disminución en la expresión de las tres isoformas de NOS (Haviarova et al., 2011).

Además de los sistemas enzimáticos mencionados anteriormente, existen otras enzimas como la lipoxigenasa, cicloxigenasa, citocromo P-450 monoxigenasa, entre otras, que pueden generar ROS en la pared vascular en ciertas circunstancias (Bonomini et al., 2008). Asimismo, en situaciones patológicas en las que se produce el desacoplamiento de la eNOS, los ROS procedentes de la cadena de transporte mitocondrial pueden salir al citoplasma (Bonomini et al., 2008).

3. Principales mecanismos de defensa antioxidante endógenos.

La mayor parte de los radicales libres generados por el organismo son eliminados mediante unos mecanismos de defensa, presentes en todas las células, conocidos como antioxidantes, secuestradores de radicales libres (*scavenger*) o reductores. Un antioxidante se puede definir como una sustancia que, a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene su oxidación (Halliwell and Whiteman, 2004). Sin embargo, es necesario distinguir también entre la actividad antioxidante y la actividad estabilizadora de RL o *scavenger*. La primera está determinada completamente por la reactividad de un antioxidante frente a RL, lo cual puede ser caracterizado por la velocidad de esa reacción. La segunda mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa. Por lo tanto, una alta actividad *scavenger* no siempre se correlaciona con una actividad antioxidante.

Los antioxidantes pueden ser generados por las propias células o incorporados exógenamente en la dieta. Los sistemas de defensa antioxidante en el organismo pueden clasificarse en dos grupos: sistemas de defensa enzimáticos y sistemas de defensa no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos se encuentran dentro de la célula como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, SOD, y la catalasa. Además de los sistemas enzimáticos existen pequeñas moléculas en los espacios extracelulares, en la sangre así como en los fluidos corporales, que constituyen una primera línea de defensa frente a ROS, donde los sistemas enzimáticos están ausentes o en cantidades muy pequeñas. Estas pequeñas moléculas antioxidantes pueden ser hidrosolubles, localizadas en los fluidos, como el glutatión o la vitamina C, o liposolubles, localizadas en las membranas celulares, como la vitamina E.

3.1. Sistemas de defensa antioxidante enzimáticos.

3.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).

La superóxido dismutasa (SOD) constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula para hacer frente a la producción de radical primario $O_2^{\bullet-}$. Esta

enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno.

Se han caracterizado tres isoenzimas en mamíferos que difieren tanto en su localización celular como en los cofactores metálicos de sus centros activos: Cu/Zn-SOD (SOD1); Mn-SOD (SOD2) (Fridovich, 1974, Fridovich, 1975, McCord and Fridovich, 1988), y la EcSOD (SOD3) (Nozik-Grayck et al., 2005). SOD1 es la principal SOD intracelular, localizada en el citoplasma con una pequeña fracción en el espacio inter-membrana de la mitocondria (Crapo et al., 1992). Su actividad depende de la presencia de Zn y principalmente de Cu (Valentine et al., 1979). El mecanismo de *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ involucra la reducción y re-oxidación del Cu en el sitio activo de la enzima (McCord and Fridovich, 1969). Es sensible al cianuro, lo cual ayuda a distinguirla de la SOD2.

La SOD2 es una enzima que contiene manganeso (Mn) localizada en la matriz mitocondrial (Weisiger and Fridovich, 1973). El Mn presente en el sitio activo sirve para catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet-}$. A diferencia de la SOD1, la SOD2 no es inhibida por H_2O_2 (Beyer and Fridovich, 1987) y su vida media en suero es de 5-6 h comparado con los 6-10min de la SOD1 (Gorecki et al., 1991). La SOD3, es una SOD1 extracelular, fundamentalmente encontrada en el espacio vascular extracelular, en la superficie celular y una pequeña fracción en el plasma y fluidos extracelulares. Su distribución en los distintos tejidos varía entre especies, pero en general la SOD3 se expresa de manera altamente selectiva en vasos sanguíneos, pulmones, riñones, útero y en menor proporción en el corazón (Folz and Crapo, 1994, Marklund, 1984). En tejidos dañados y aterosclerosis, la SOD3 ha sido también encontrada en células inflamatorias (Fukai et al., 1998).

3.1.2. Catalasa.

La catalasa es una hemo-enzima antioxidante complementaria de las SODs, debido a que cataliza la transformación de H_2O_2 celular a oxígeno y agua particularmente en situaciones de estrés oxidativo. La reacción enzimática se produce en dos pasos en los que utiliza dos moléculas de H_2O_2 . Puede

descomponer millones de moléculas de H_2O_2 en cada segundo ($\sim 10^7$ M/s) sin producir radicales libres (Young and Woodside, 2001). La catalasa que encontramos en humanos es la mono funcional compuesta por cuatro subunidades, lo que la hace muy resistente a cambios pH, desnaturalización térmica y proteólisis. La cantidad y actividad de la enzima depende del tejido donde se localice (Goyal and Basak, 2010); así, la actividad de la catalasa es alta en el hígado y en eritrocitos, medianamente alta en el riñón y en el tejido adiposo, intermedio en el pulmón y páncreas, y muy baja en el corazón y el cerebro. En humanos, la catalasa no se encuentra en las células musculares lisas ni en células endoteliales; aunque, recientemente se ha publicado que la catalasa, así como la EcSOD y la glutatión peroxidasa, pueden ser liberados al plasma por neutrófilos (Berzosa et al., 2011).

En respuesta a bajas concentraciones de H_2O_2 la catalasa y la GPx están sujetas a fosforilación, lo cual resulta en un aumento de actividad de la enzima. Elevadas concentraciones de H_2O_2 producen una degradación de la enzima resultando en una reducción de la destrucción del H_2O_2 y en muerte celular.

3.1.3. Glutatión peroxidasa.

La glutatión peroxidasa (GPx) desempeña un papel fundamental en la defensa antioxidante protegiendo las membranas frente a la peroxidación lipídica (Groussard et al., 2003). Participa en la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos orgánicos a expensas del glutatión (GSH).

Se han identificado cuatro tipos de GPx: 1) la citosólica o clásica (cGPx) la primera seleno proteína identificada en mamíferos, 2) la de hidroperóxidos de fosfolípidos (PHGPx), 3) la plasmática (pGPx) y 4) la forma gastrointestinal (GI-GPx) (Brigelius-Flohe, 1999). La especificidad de las GPx frente a los hidroperóxidos varía de forma clara entre cada una de ellas. La cGPx solamente es capaz de reducir hidroperóxidos solubles, tales como H_2O_2 , y algunos hidroperóxidos orgánicos análogos a los producidos de ácidos grasos, por ejemplo el hidroperóxido de cumeno o hidroperóxidos t-butilo. Los PHGPxy pGPx son capaces de reducir hidroperóxidos de lípidos más complejos, en tanto que la GI-GPx tiene una especificidad similar a la cGPx. Otro aspecto importante a considerar es que todas

las GPx utilizan glutatión como sustrato tiol. La pGPx es capaz de utilizar tioredoxina y glutaredoxina en vez de GSH como agente reductor en condiciones fisiológicas (Wolin, 2011). La principal fuente de pGPx es el riñón y su papel fisiológico parece estar relacionado con hacer frente al estrés oxidativo y/o la regulación del tono extracelular de hidroperóxidos implicado en la biosíntesis de mediadores lipídicos catalizados por lipoxigenasas (Bjornstedt et al., 1994).

3.2. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos.

3.2.1. Glutatión.

El glutatión es un péptido compuesto por tres aminoácidos: γ -L-glutamina, L-cisteína y glicina. El glutatión es el mayor componente sulfhidrilo no proteico presente en las células de mamíferos a concentraciones de 0,5 a 10 mM. Este tiol libre tiene importantes funciones biológicas durante la proliferación celular, en el transporte de aminoácidos, en la síntesis de proteínas y ADN, como reserva de cisteína y en la protección celular contra la oxidación. Esta protección frente al daño causado por oxidantes como los radicales libres, se debe al grupo sulfhidrilo (SH) de la L-cisteína.

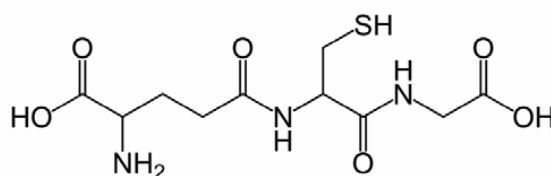


Figura 6. Estructura química del glutatión reducido (GSH)

El glutatión puede encontrarse en dos formas: reducida (GSH) y oxidada (GSSG), en la que dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro. El paso de la forma reducida GSH a la oxidada GSSG está catalizado por la glutatión peroxidada.

El GSH es abundante en el citosol (1-11 mM), núcleo (3-15 mM) y mitocondria

(5-11 mM) y es el principal antioxidante en estos compartimentos. El GSH es sintetizado en el citosol por acción secuencial de la glutamato-cisteinaligasa y la glutatión sintetasa y posteriormente transportado a las mitocondrias a través de un mecanismo facilitador. El GSH sintetizado en el interior de las células puede también ser exportado, a velocidades altas, a través de la membrana plasmática hacia espacios extracelulares; así cantidades importantes son secretadas al plasma sanguíneo, pero su vida media está en el orden de segundos – minutos (Ballatori et al., 2009).

Los principales roles protectores del GSH contra el estrés oxidativo comprenden: 1) su participación como cofactor de varias enzimas de detoxificación, tales como GPx y glutatión transferasa (GST), 2) su participación en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; 3) su acción *scavenger* de $\bullet\text{OH}$ y oxígeno *singlete*, detoxificando H_2O_2 y peróxidos de lípidos por acción catalítica de la GPx (Figura 4, R5) y 4) su capacidad para regenerar los más importantes antioxidantes, ácido ascórbico y vitamina E, a sus formas activas (Valko et al., 2007). El glutatión oxidado es acumulado en el interior de las células y el ratio GSH/GSSG es una medida del estrés oxidativo de un organismo (Jones et al., 2000). El GSSG se encuentra a concentraciones mucho menores que el GSH. La regeneración del GSSG es catalizada por la glutatión reductasa enzima que utiliza el NADPH como donador de electrones. Una elevada concentración de GSSG puede producir el daño oxidativo.

3.2.2. Ácido ascórbico.

El ácido ascórbico actúa como un antioxidante soluble en agua a nivel intra y extracelular. Es una sustancia reductora fisiológica y cofactor de enzimas. El L-ascorbato participa en numerosas reacciones enzimáticas (Padayatty and Levine, 2001), actúa como antioxidante celular (Asard, 2002) y hace posible reciclaje del tocoferol de la membrana plasmática que protege frente a la peroxidación de lípidos (Mayet et al., 1998).

Su presencia en fluidos biológicos como el plasma está regulada a través de mecanismos que incluyen canales aniónicos (Wilson, 2005), intercambio ascorbato–

ascorbato, hemicanales (Ahmad and Evans, 2002), intercambio glutamato–ascorbato- (Grunewald, 1993), y exocitosis (von Zastrow et al., 1986). Teóricamente, el ascorbato liberado por las células debería permitir reemplazar el ascorbato extracelular que ha sido oxidado o degradado (Konya and Ferdinandy, 2006), manteniendo la homeostasis en los fluidos extracelulares. Se ha estimado que los eritrocitos de humanas tienen la capacidad de regenerar el ascorbato total sanguíneo cada 3 minutos (May et al., 1998). Sin embargo, su concentración fisiológica en tales fluidos sucede a expensas de otros reductores intracelulares (GSH, NADPH).

3.2.3. Vitamina E.

La vitamina E es un antioxidante liposoluble capaz de eliminar radicales libres y de inhibir procesos de peroxidación lipídica de las membrana (Atkinson et al., 2008). Este bloqueo se produce porque el radical lipoperoxilo, en vez de atacar a un segundo lípido insaturado, reacciona con el hidroxilo fenólico de la vitamina E, produciendo un lipoperóxido y un radical de la vitamina E, el radical tocoferilo. Las formas resonantes del radical de la vitamina E no son suficientemente reactivas para seguir propagando la peroxidación.

3.2.4. Coenzima Q10

El coenzima Q10 o ubiquinona 50 es un antioxidante liposoluble, que difunde rápidamente a través de la membrana mitocondrial interna y es un constituyente natural de la cadena de transporte de electrones, con capacidad de estabilizar membranas por inhibir la peroxidación lipídica, debido a la capacidad del ubiquinol, forma reducida del coenzima Q10, de eliminar radicales libres (Alleva et al, 1995).

3.2.5. Ácido úrico

Es un producto de desecho del metabolismo de las purinas, puede secuestrar directamente especies radicales como peroxilos. Además puede actuar en la fase de

prevención de la oxidación, por un lado atrapando ROS y por otro uniéndose a iones de Cu y Fe (Nieto et al 2000, Ghiselli et al 2000).

Tabla 4. Resumen de los principales antioxidantes biológicos.

Antioxidantes no enzimáticos	Localización	Acción
GSH	Intracelular, alveolos	Sustrato de la GPx, reacciona con RL orgánicos, regenera la vitamina C. Reacciona con $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$
Vitamina E	Membranas lipídicas y lipoproteínas plasmáticas	Depura múltiples RL y detiene la peroxidación lipídica.
Vitamina C	Fluidos intra- y extracelulares	Protege frente a la peroxidación lipídica, regenera la vitamina E.
Ac. Úrico	Amplia distribución	Depura $\text{O}_2^{\bullet-}$, HCl, $\text{ROO}\bullet$, quela metales de transición.
Cisteína	Amplia distribución	Reduce compuestos orgánicos donando electrones del sulfidril.

Coenzima Q	Cadena de transporte electrones en mitocondria	Protege frente a la peroxidación lipídica, regenera la vitamina E.
Antioxidantes enzimáticos	Localización	Acción
SOD	Citosol,núcleo, lisosoma,mitocondria, plasma y otros fluidos	Cataliza $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2
Catalasa	Peroxisoma y citosol	Cataliza depuración de H_2O_2 . Reduce hidroperóxidos de metilo y etilo.
GPx	Intracelular	Cataliza reducción de H_2O_2 .
GR	Intracelular	Regenera GSH a partir de GSSG.

C. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se relaciona con el envejecimiento y más de 100 patologías como la aterosclerosis, la Diabetes Mellitus, la enfermedad de Alzheimer etc...Estas patologías pueden agruparse en varias categorías. El primer grupo

comprende enfermedades caracterizadas por cambios en el estado redox tiol/disulfuro y la tolerancia a la glucosa promovida por ROS, conocido como “estrés oxidativo mitocondrial”. Entre otras cabe destacar el cáncer y la Diabetes Mellitus. El segundo grupo comprende enfermedades caracterizadas por una condición “inflamatoria oxidativa” y el incremento de ROS inducido por NADPH oxidasa y xantina oxidasa. El papel causal o propagador de los ROS/RNS en enfermedades humanas asociadas con el estrés oxidativo es un tema clave en múltiples investigaciones. Sin embargo, el hallazgo de estrés oxidativo en condiciones patológicas ha planteado el uso de biomarcadores de estrés oxidativo/nitrosativo en el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, prevención y tratamiento para impedir o detener el desarrollo de complicaciones asociadas a estas enfermedades.

Debido a que los productos de la reacción de los ROS/RNS con biomoléculas son más estables que los propios ROS/RNS, muchos de estos metabolitos estables y/o la concentración de productos diana de oxidación han sido establecidos como biomarcadores oxidativos. Se han propuesto una gran variedad de marcadores biológicos para evaluar el estrés oxidativo, cuyos indicadores han sido desarrollados para determinar el daño mediado por radicales libres o la generación de radicales libres *in vivo*, dentro de las cuales se incluyen las mediciones de lípidos, proteínas y AND oxidados. De todas las biomoléculas que pueden ser atacadas por RL, los lípidos son probablemente los más susceptibles, específicamente los poliinsaturados que son fácilmente oxidables y forman parte de las membranas celulares.

Un biomarcador válido de estrés oxidativo/nitrosativo debería reunir las siguientes características:

1. Ser un producto estable, no susceptible de experimentar sesgos, oxidación, o pérdida durante el manejo, procesamiento, análisis y almacenamiento de la muestra. - 43 -

2. Estar directamente implicado en el inicio y/o progresión de la enfermedad.

3. Estar accesible en el tejido diana o un sustituto válido que cuantitativamente refleje la modificación oxidativa del tejido en cuestión.

4. Estar presente en concentraciones suficientemente altas para representar un producto significativo.

5. Ser específico para las especies reactivas en cuestión y libre de sufrir modificaciones inducidas por la dieta.

6. Ser cuantificable por un ensayo específico, sensible, reproducible y no invasivo.

7. Ser fácil de detectar y medir en la población.

8. Estar presente en concentraciones que no varíen a lo largo del tiempo, de forma importante, en la misma persona bajo las mismas condiciones.

La validación de biomarcadores requiere de muchas etapas, que pueden ser agrupadas en: (a) la validación analítica, la cual incluye el desarrollo de procedimientos, análisis de material de referencia y control de calidad y (b) la validación epidemiológica, que menudo es difícil de lograr debido a la complejidad de las enfermedades asociadas con estrés oxidativo. De hecho, es altamente improbable que un simple biomarcador pueda sustituir una evidencia clínica.

Se han propuesto numerosos indicadores para medir el *status* prooxidante o antioxidante en diversas patologías, pero ningún de ellos puede ser considerado como “*gold standard*” para medir el estrés oxidativo o cambios en el *status* oxidativo. Los estudios basados en la medida individual de estos indicadores arrojan resultados conflictivos, dado que sólo describen parcialmente el *status* oxidativo y suelen mostrar alta variabilidad intra- e intersujetos (Veglia et al., 2006, Veglia et al., 2009a, Veglia et al., 2009b).

Aunque los síntomas clínicos de una enfermedad son puntos finales en sí mismos; sin embargo, como es obvio, no permiten la detección temprana y por tanto la prevención de enfermedades asociadas a estrés oxidativo. Los objetivos de un biomarcador son el de ayudar en el diagnóstico sintomático y pre-sintomático de la enfermedad y proporcionar puntos finales sustitutos para demostrar la eficiencia clínica de nuevos tratamientos.

Los biomarcadores pueden proporcionar información en tres niveles progresivos del desarrollo de la enfermedad:

1. Como medida final del daño a biomoléculas tales como lípidos y proteínas

2. Como marcador funcional
3. Como puntos finales relacionados a una enfermedad específica.

1. Principales biomarcadores.

A altas concentraciones, los ROS/RNS pueden ser importantes mediadores de daños en estructuras celulares, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Se sabe que el $\bullet\text{OH}$ reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN, dañando bases púricas y pirimidínicas y también la desoxirribosa. Por otro lado, se conoce que la formación de ROS inducido por metales no solamente daña el ADN, sino también otros componentes celulares tales como los residuos de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son extremadamente sensibles a la oxidación. Una vez formados, los $\text{ROO}\bullet$ son reconfigurados mediante ciclación para producir endoperóxidos y finalmente malondialdehído (MDA) como producto de oxidación de lípidos. Sin embargo, el aldehído principal de la oxidación de lípidos es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Ambos productos suelen ser tóxicos y mutagénicos. Los residuos aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas son también susceptibles a la oxidación por ROS/RNS. La oxidación de residuos de cisteína podría derivar en la formación de disulfuros entre grupos tioles de proteínas ($-\text{SH}$) y tioles de bajo peso molecular, en particular glutatión (GSH). La concentración de grupos carbonilos, generado por diferentes mecanismos es una buena medida de la oxidación de proteínas mediada por ROS. Los productos avanzados de glicación (AdvancedGlycatedEndproducts, AGEs) son una clase de productos complejos, que resultan de la reacción de carbohidratos y grupos amino libres de las proteínas. El daño sobre las macromoléculas constituye la base sobre la que descansa la clásica definición de estrés oxidativo y la implicación de estos en algunas enfermedades.

1.1 Carbonilos, biomarcador de oxidación proteica.

La modificación oxidativa de proteínas está asociada a ciertos procesos fisiológicos y patológicos. Aminoácidos, péptidos y proteínas son susceptibles de ser sustrato de los ROS. Los ROS pueden oxidar directamente las proteínas u originar

derivados oxidados lipídicos o glucídicos que reaccionan con los grupos funcionales de las proteínas (Fritz and Peterson, 2011). Una primera etapa implica la desaminación o decarboxilación del aminoácido proteico. La cisteína, histidina y lisina son los aminoácidos con mayor tendencia a la modificación oxidativa por compuestos carbonilo (Esterbauer et al 1991). El daño causado a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Estos cambios conformacionales pueden hacer a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturalización o producir pérdida de su actividad biológica. En el caso de la patología varicosa se ha demostrado una elevación de MDA en múltiples estudios mientras que los carbonilos no se han determinado salvo en una publicación (Condezo et al., 2013). Parece que en el caso de la patología venosa los carbonilos que se han determinado sean derivados de oxidados lipídicos reactivos.

1.2. 3-nitrotirosina, biomarcador de oxidación proteica.

La nitración de la tirosina es un proceso que ocurre en dos pasos (Martinez and Andriantsitohaina, 2009). El primer paso es la generación del radical tirosil por oxidación de la tiroxina por especies generadas del peroxinitrito. En un segundo paso el radical tirosil reacciona con NO_2 para formar 3- NO_2 -Tyr (3-nitrotirosina). Luego ésta es usada como biomarcador del daño originado por ONOO- que es más reactivo y tóxico que el $\text{NO}\bullet$.

La 3-nitrotirosina (3-NT) se mostró por primera vez en lesiones ateroscleróticas humanas, más tarde se encontró en gran número de tejidos (Duncan, 2003) afectados por otras enfermedades (esclerosis múltiples, Alzheimer, asma, infarto cerebral, hepatitis crónica, diabetes mellitas, etc...). Uno de los valores principales de la nitrotirosina es que proporciona fuerte evidencia de que la producción de NO fue suficiente para producir productos observables en prácticamente todas las enfermedades humanas. Mientras el ONOO- daña lípidos, ADN y otros constituyentes celulares, algunas investigaciones se han centrado en el daño a proteínas por razones biológicas. La 3-NT sirve como marcador de

exposición al ONOO⁻ y la nitración de la tirosina por si misma puede perjudicar la función celular. El papel del ONOO⁻ en los organismos continúa siendo intensamente examinado y establecer su significado es más complicado que lo previsto previamente. Esta complejidad se debe a dos razones fundamentalmente. La primera razón es que la 3-NT era considerada originalmente como marcador específico de daño por el ONOO⁻, pero actualmente esto no es así. La nitración puede ocurrir *in vivo* independientemente de ONOO⁻ por ejemplo a través de las enzimas peroxidasas (Hurst, 2002). La segunda razón es la confusión que se genera por métodos de análisis subóptimos para cuantificar trazas de 3-NT en tejidos y fluidos y la importancia del análisis de estos datos para definir el papel de ONOO⁻.

D. ESFUERZO DE CORTE.

El esfuerzo de corte es clave en la regulación del tono vascular y en la remodelación de su estructura. Todos los vasos sanguíneos del organismo están dotados de una única capa de células endoteliales y éstas juegan un papel fundamental en la detección del ambiente químico y mecánico de los vasos. El primer estímulo mecánico que actúa sobre los vasos es la tensión de cizalla y las células endoteliales tienen sensores de esfuerzo de corte. Existe una relación entre la detección del esfuerzo de corte, la producción de RL y la adaptación funcional y estructural de los vasos sanguíneos.

En 1994 Laurindo et al. objetivaron la formación de RL tras cambios de flujo *in vitro* e *in vivo*, desde entonces se ha establecido que la tensión de cizallamiento o esfuerzo de corte (WSS) provoca no sólo la generación de NO[•] sino también de RL en las células endoteliales y en tejidos.

La tensión de cizallamiento es la fuerza de arrastre por unidad de superficie que actúa sobre las células endoteliales. Es causada por el gradiente local de velocidad (la velocidad de cizallamiento) y se calcula como el producto de la velocidad de cizalla y la viscosidad. Se estima a partir de la relación de Poiseuille y es útil para comprender la adaptación vascular: si aumenta el flujo, inicialmente WSS aumenta proporcionalmente. La detección y señalización de estos cambios induce un incremento en el radio del vaso por la dilatación y el remodelado para luego restaurar el esfuerzo de corte hacia su nivel original. Por lo tanto, el esfuerzo de

corte se considera que es una cantidad regulada, fundamental para la adecuación del calibre del vaso al flujo. La alteración del flujo sanguíneo en los vasos grandes pueden sentar las bases patológicas de la remodelación vascular, tales como la formación de aneurismas y la aterosclerosis, a través de la participación de los ROS y la inflamación. El esfuerzo de corte entonces, parece ser un estímulo clave en la regulación de la estructura y calibre vascular (Hanke et al., 2009). Está claro que las vías de señalización incluyen el NO y RL, además de otras señales derivadas del endotelio.

Cuando hablamos de patología venosa, la diversidad de signos y síntomas que presentan los pacientes está relacionada con la hipertensión venosa. El desarrollo de esta hipertensión implica un mecanismo de reflujo en el 70-80% de los casos u obstrucción. Esta alteración hemodinámica ha sido estudiada en modelos animales a través de la realización de una fístula arterio-venosa (Takase S. et al.; 2004). El estudio sugiere que las válvulas venosas pueden tolerar un incremento de presión durante periodos limitados y que el incremento de presión prolongado conlleva un proceso inflamatorio que deteriora las válvulas y condiciona el reflujo. Los cambios en la tensión de cizallamiento se traducen vía endotelio a través de una compleja red de señalización que incluiría en un primer punto canales iónicos y el glicocálix celular. Posteriormente puede modificar la expresión de genes en estas células endoteliales. Los mecanismos causantes de la destrucción valvular durante las fases primarias de la insuficiencia venosa no han sido suficientemente estudiados en humanos y son desconocidas.

Los efectos de los diversos perfiles de cizalladura son generalmente estudiados en cultivos celulares y el fondo para tales estudios es la aterogénesis en las regiones con perturbación de flujo. Aunque estos estudios de células aisladas han proporcionado gran parte de información sobre el esfuerzo de corte inducido por señalización de ROS, existen otros factores que influyen en las respuestas como la MEC. Las explicaciones a las respuestas celulares tan diferentes ante un flujo lineal constante u oscilante se pueden asociar a sensores específicos de esfuerzo para cada uno de los patrones de flujo. Existen varios argumentos que los apoyan. Uno de ellos son los canales de potasio de las células endoteliales que traducen una señal diferente se trate de uno u otro tipo de flujo. Los cambios en el potencial de

membrana producen cambios en los niveles de calcio intracelular y la activación o no de diferentes enzimas como la eNOS o la NADPH oxidasa. Otros sensores de flujo son el citoesqueleto, el glicocalix y los cilios. En respuesta al flujo laminar las células son capaces de alargarse en la dirección del flujo, mientras que si el flujo es oscilante las células permanecen poligonales y estáticas en los cultivos celulares variando así su citoesqueleto. El glicocalix se sitúa en la parte luminal de las células endoteliales y actúa de mecano-receptor de tal forma que se ha visto que la depleción de glicoproteínas puede bloquear la producción de NO•, además algunos componentes del mismo reaccionan con ROS y alteran su composición (Pahakis et al. 2007).

En resumen, el esfuerzo de corte (cambios en el perfil de velocidad) es el estímulo clave para la regulación del calibre y estructura vascular. Es claro que en las vías de señalización se incluyen el NO• y los ROS así como otras señales de mediación. El papel de los ROS se hace dominante en los casos en los que el esfuerzo de corte cambia rápidamente o tiene un componente pulsátil. Esto se debe a que se activan diferentes sensores de cizalladura dependiendo del tipo de flujo y a la activación de distintas vías de ROS.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A. HIPÓTESIS

La IVC supone un problema de salud que afecta principalmente a los países desarrollados. Históricamente se ha intentado explicar la enfermedad varicosa por un mecanismo de reflujo y alteración anatómica valvular, asociándose generalmente a actividades profesionales en bipedestación. Investigaciones actuales a nivel celular y bioquímico nos han mostrado que la etiología de esta enfermedad es compleja y multifactorial jugando un papel importante el estrés oxidativo en estadios iniciales de la enfermedad.

Se conoce por estudios previos que los sujetos que trabajan en bipedestación tienen niveles de RL más elevados en plasma debido a la hipoxia y estasis que produce la bipedestación a nivel venoso de los MMII. Sin embargo una mayor producción de RL no es necesariamente indicativa de estrés Oxidativo, ya que pueden estar activados los sistemas de defensa antioxidantes. El objetivo principal de esta Tesis ha sido valorar el estado Oxidativo global de individuos que trabajan en bipedestación en comparación con sujetos que trabajan en sedestación, incluyendo marcadores de daño oxidativo de proteínas y de capacidad antioxidante

en plasma que nos indique si hay daño inducido por la bipedestación. Puesto que el diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante eco-doppler; hemos evaluado si existe una asociación entre determinados patrones hemodinámicos y distintos parámetros plasmáticos de estado Oxidativo, independientemente de la actividad laboral, que sirvan como posibles marcadores diagnósticos de predisposición al desarrollo de enfermedad varicosa.

B. OBJETIVOS

El objetivo de la primera parte de esta Tesis Doctoral ha sido determinar si existen diferencias en los parámetros plasmáticos relacionados con el estado oxidativo en sujetos sanos que desarrollan su actividad laboral en bipedestación y los que la desarrollan sentados. Este objetivo general lo podemos dividir en los siguientes objetivos parciales:

1.Determinación de posibles diferencias en la capacidad antioxidante del plasma medida por el método CUPRAC-BCS, método SOSA, niveles de tioles y actividad catalasa, entre el plasma de sujetos que trabajan sentados y sujetos que trabajan en bipedestación.

2.Determinación de posibles diferencias en los marcadores de estrés oxidativo midiendo niveles de proteínas carboniladas y 3-nitrotirosina, entre el plasma de sujetos que trabajan sentados y sujetos que trabajan en bipedestación.

3.Determinación de posibles diferencias en los niveles de óxido nítrico midiendo niveles de nitratos, entre el plasma de sujetos que trabajan sentados y sujetos que trabajan en bipedestación.

4.Determinación de posibles diferencias a nivel de flujo venoso (shear stress) en el sistema venoso superficial de MMII, midiendo el parámetro EcoSuma, entre el plasma de sujetos que trabajan sentados y sujetos que trabajan en bipedestación.

El objetivo de la segunda parte de esta Tesis ha sido correlacionar los hallazgos en los marcadores plasmáticos antes mencionados, con los datos obtenidos del parámetro EcoSuma con el fin de valorar si el tipo de flujo que presentan individualmente las venas del sistema venoso superficial de los MMII puede contribuir al estado oxidativo del individuo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Sujetos de estudio

Los participantes en el estudio fueron sometidos a una encuesta (anexo 1), examen físico y estudio eco-doppler de los miembros inferiores previo a la obtención de la muestra sanguínea. Se agruparon a un total de 22 participantes con las siguientes características: sujetos que trabajan en bipedestación la mayor parte de su jornada laboral y sujetos que desarrollan su actividad profesional la mayor parte del tiempo en sedestación.

Se obtuvo consentimiento informado de todos los sujetos (anexo 2) y el estudio fue aprobado por el Comité de Bioética.

Tabla 5. Criterios de inclusión empleados para la participación de los sujetos en el estudio.

<i>Criterios de inclusión</i>
IMC menor de 25 (sin sobrepeso)
Normotensos
No fumadores
Ausencia de Diabetes Mellitus
Ausencia de dislipemias
Menores de 60 años
Sin otras patologías asociadas a estrés oxidativo

2. Reactivos

En la presente tesis doctoral se usaron los siguientes reactivos:

Tabla 6. Reactivos utilizados durante la fase experimental.

Casa comercial	Número de catálogo
<i>BioRad</i>	
Reactivo de Bradford (<i>Protein Assay</i>)	161-0700
<i>Calbiochem</i>	
Catalasa de hígado de bovino 12660 U/mg	
<i>Fluka</i>	
O-Ftaldehído	9253
EGTA	
Luminol	3677
Xantina oxidasa de suero de leche	
<i>Merck</i>	
Cloruro de sodio (NaCl)	536092
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	A387573
Fosfato de potasio dibásico trihidratado (K ₂ HPO ₄)	A543799
Hidróxido de sodio (NaOH)	B553298
Nitrato de sodio	106537
<i>Panreac</i>	
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	231019
Acido clorhídrico (HCl)	211252.1611
Acido tricloroacético	74385
Acetato de etilo	219001

Casa comercial	Número de catálogo
<i>Panreac</i>	
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	231019
Acido clorhídrico (HCl)	211252.1611
Acido tricloroacético	74385
Acetato de etilo	219001
<i>Sigma-Aldrich</i>	
Acido cumárico	C9008
Acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)	D8130-1G
Acido metafosfórico (HPO ₃)	23,927-5
Albumina de suero de bovino	A7906-10G
10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (<i>Amplex Red</i>)	90101-5MG-F
Cloruro de vanadio III	20,872-2
Coelenterazina hcp	C3355
2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH)	D19,930-3
EGTA	E4378-100G
L-Glutatión reducido (GSH)	G4251-300 MG
Hidrocloruro de guanidina	G4505-25G
Hipoxantina	H9377-5G
6-Hidroxi-2,5,7-tetrametilcroman-2- acido carboxílico (Trolox)	23,881-3
N-naftil-etilendiamina dihidrocloruro	22,248-8
Peroxidasa de rábano tipo I (HRP)	P8125-25KU
Sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico	B1125-1G
Sulfanilamida	S-9251
Sulfato cúprico pentahidratado	C-7631
Superóxido dismutasa (SOD) de bovino	S9697
Tris base	T1503-1 Kg
Triton X-100 para electroforesis	T8532-100ML
<i>Surmodic</i>	
Bloqueante sin proteína	SB01-0125-01
<i>Pierce</i>	
MemCode™	24585
<i>Abcam</i>	
Anticuerpo primario anti 3-nitrotirosina	ab61392
Anticuerpo secundario conjugado IgG-HRP	

3. Equipos

- Eco Doppler color, marca Toshiba APLIO MX. Sonda lineal 7.4-10 MHz. (Toshiba Medical Systems Corporation).
- Centrifuga MEDIFRIGE (P Selecta).
- Lector de placas multidetección Synergy™ HT (BioTek Instruments, Inc., Potton, UK).
- Luminómetro de placas GloMax® 96 (ProOmega Corporation, Madison, USA).
- Baño maría (Unitronic 320 OR).
- Incubador IG150 (Jouan).
- pH-metro XS pH 510 (EUTECH Instruments).
- Sistema de agua desionizada Ultra pure Water Milli-Q Plus (Millipore).

B.MÉTODOS

1. Diagnóstico clínico.

Mediante una encuesta, el examen físico y un estudio eco-doppler color de las extremidades inferiores, se seleccionaron un total de 22 participantes en el estudio. 11 trabajan en bipedestación la mayor parte de su jornada laboral y los 11 restantes trabajan en sedestación la mayor parte de su horario de trabajo.

Los datos obtenidos en la encuesta se recogen en una tabla que resume las características de los participantes. Se excluyeron los sujetos con enfermedades que se conocen aumentan el estrés oxidativo.

Tabla 7. Criterios de inclusión empleados para la selección de los sujetos participantes.

Menores de 60 años

IMC menor de 25 kg/m, sin sobrepeso

Normotensos

Ausencia de diabetes

No fumadores

Sin dislipemia

Sin otras patologías asociadas a estrés oxidativo

A través del examen físico determinamos que los sujetos se clasificaban en un grado CEAP 0 y mediante el estudio eco-doppler de las extremidades inferiores se descartaron los sujetos con datos de insuficiencia venosa ocultos al examen físico.

2. Diagnóstico eco-doppler.

Los sujetos incluidos en el proyecto se estudiaron de acuerdo con los conceptos anatómicos, funcionales y las características eco-doppler del sistema venoso normal.

El flujo sanguíneo de las venas normales tiene cinco características importantes: espontáneo, fásico, cesa con la maniobra de Valsalva, aumenta con la compresión distal y es unidireccional (hacia el corazón). En los sujetos en reposo normalmente hay un flujo espontáneo en las venas de tamaño grande y mediano. El significado de que un flujo venoso es fásico quiere decir que la velocidad de la sangre cambia en respuesta a una respiración tranquila y a las pulsaciones cardíacas.

Para cada sujeto del estudio se realizó una exploración completa del eje safeno mayor desde la región inguinal hasta tobillo y vena femoral en cortes transversos y longitudinales. Se realizaron en bipedestación con apoyo en la pierna contralateral y con la pierna explorada en rotación externa. Mediante estudio doppler, se realizó la maniobras de Valsalva para evaluar la ausencia de reflujo en la unión safeno femoral y femoro-ilíaca y la maniobra de compresión distal para evaluar el resto del trayecto de la VSI. Consideramos reflujo patológico > 0.5 seg.

Para el estudio de la vena safena externa y vena poplitea colocamos a los sujetos igualmente en bipedestación de espaldas al explorador con la pierna en descarga y realizamos maniobra de compresión distal. El estudio de venas perforantes también se llevo a cabo validando diámetros menores de 3.5 mm.

El fragmento de safena mayor elegido para tomar las curvas doppler se seleccionó por las características anatómicas de la misma. La VSI tiene una válvula constante a 1-2 mm distal a la unión safeno-femoral en el 94-100% de los casos (Levent Oguzkurt) y una válvula preterminal a unos 2 cm de la unión safeno-femoral. Algunas de las principales venas tributarias del cayado de la VSI se unen a ésta entre las dos válvulas. Estas venas tributarias pueden dar un flujo retrógrado incluso con una válvula terminal competente. El área seleccionada para recoger las curvas doppler fue la región de la VSI distal a la zona donde desembocan la mayorías de las venas tributarias del cayado ya que en esta región es donde el flujo espontáneo de la vena era más turbulento. Las curvas doppler fueron tomadas con el paciente en reposo, realizando una respiración normal sin hablar. Se tomaron imágenes seriadas del flujo espontáneo de la vena en esta localización y se tomaron para análisis de cada paciente aquella curva que se repetía con más frecuencia. Cada paciente presentaba un patrón de flujo espontáneo propio.

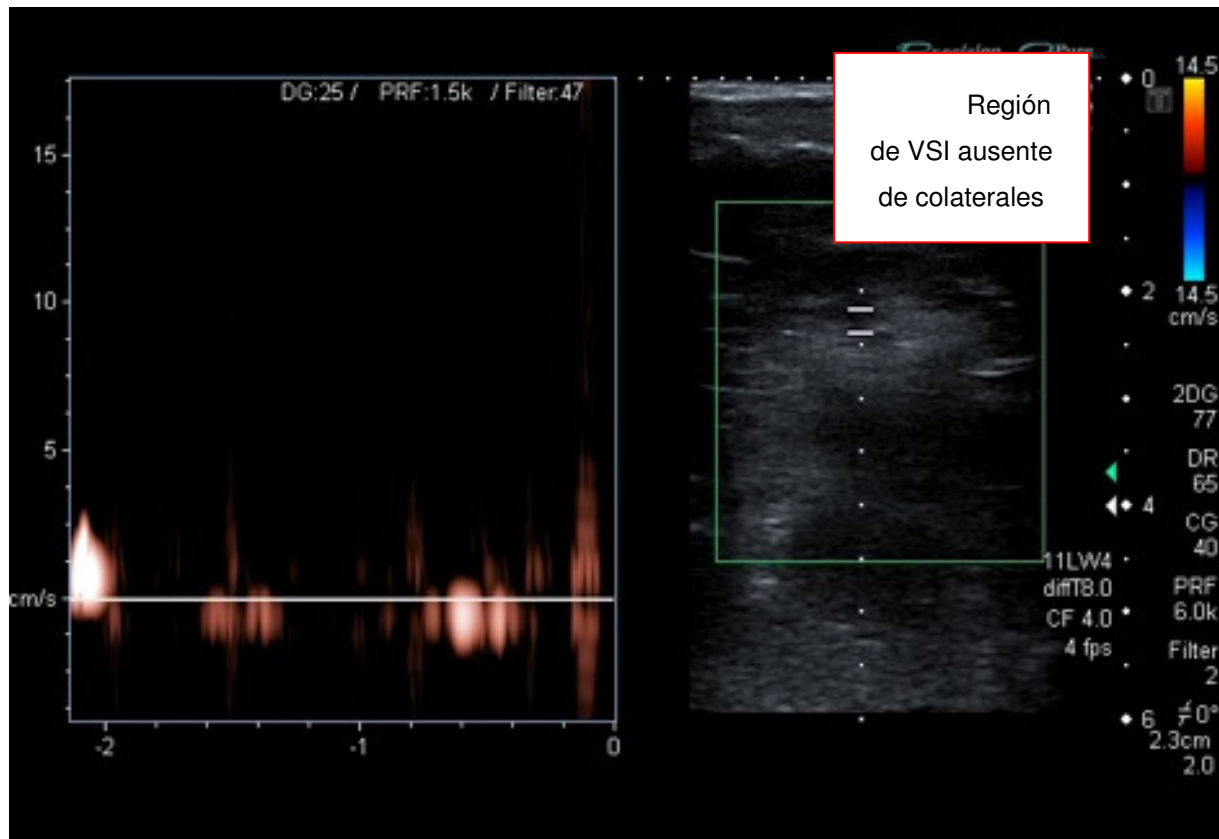


Figura 7. Imagen ecográfica y doppler de una sección de la VSI unos centímetros distal a la unión safeno-femoral en ausencia de colaterales.

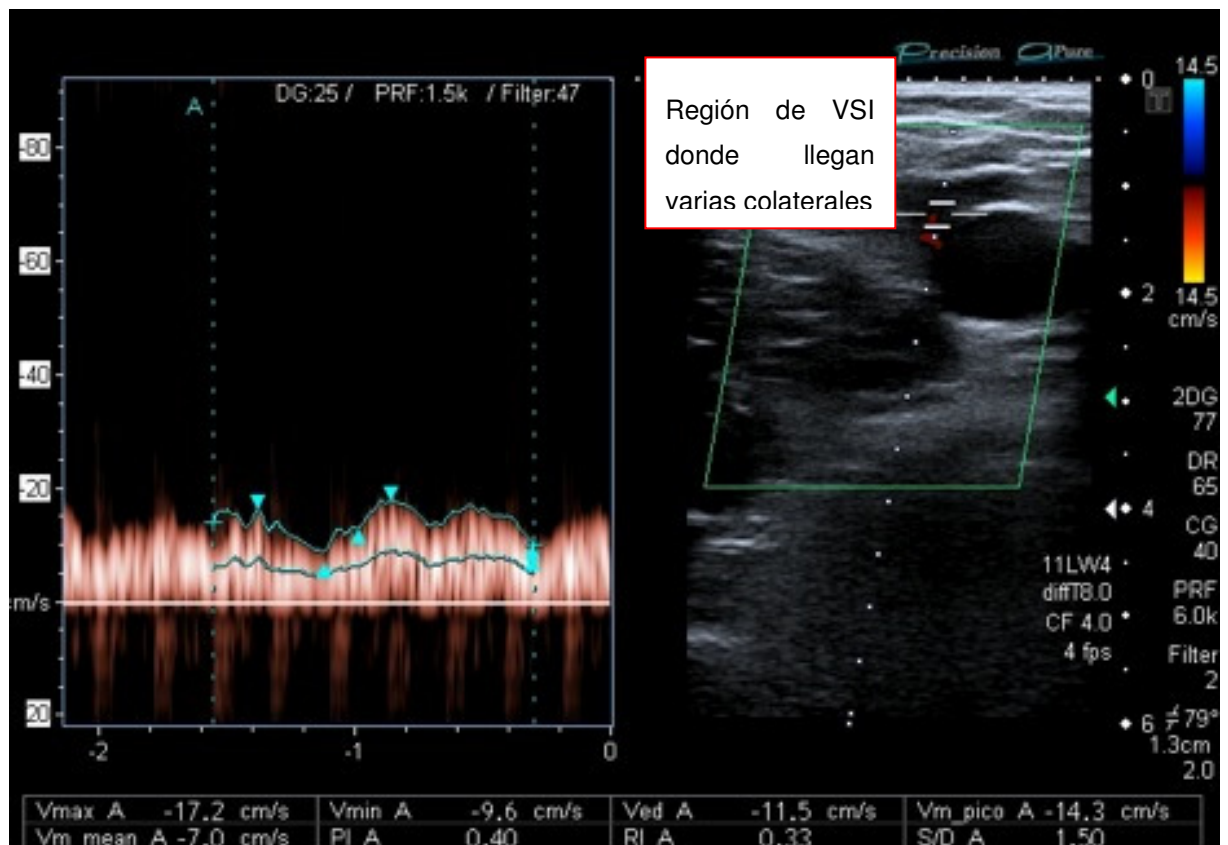


Figura 8. Imagen ecográfica y doppler de una sección de la VSI proxima a la unión safeno-femoral

Figuras 7 y 8. Imágenes ecográficas y doppler de dos secciones de la VSI. En la imagen 8 se muestra una sección de la VSI donde se ha tomado la curva doppler en ausencia de colaterales y próximo a la unión safeno-femoral. En la imagen 9 se muestra el efecto sobre la curva de flujo doppler que se produce en la región de la VSI próxima al cayado por la afluencia de las colaterales y la distorsión en el flujo que producen.

3. Obtención del parámetro *doppler*.

Para el análisis de cada curva representativa de cada sujeto del estudio se utilizó el programa ImageJ. Una vez realizado el estudio como se indica en el apartado anterior se seleccionó una imagen representativa con su correspondiente curva de flujo o curva doppler. Mediante el programa de tratamiento de imágenes la curva doppler se transforma en binario.

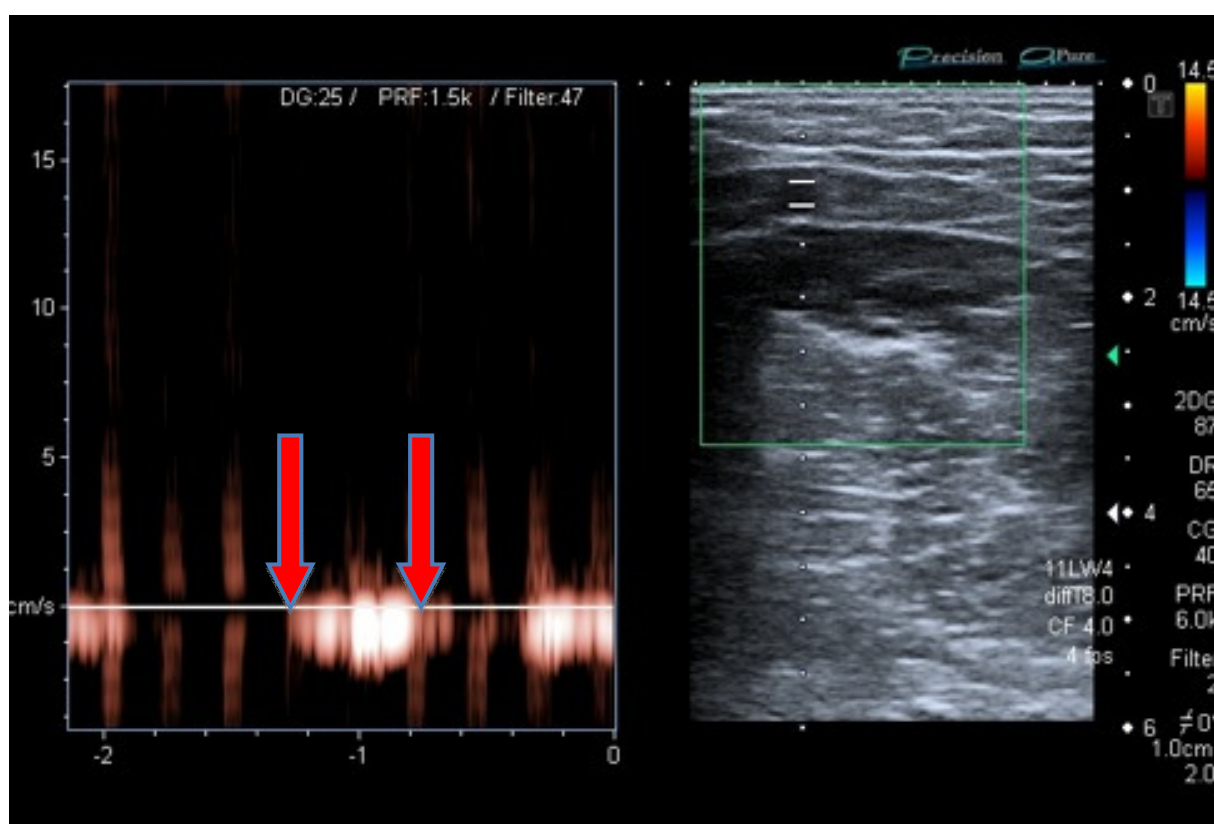


Figura 9. Curva doppler representativa de este sujeto seleccionada para transformar en binario con el programa de tratamiento de imágenes ImageJ. Las flechas rojas señalan la selección.

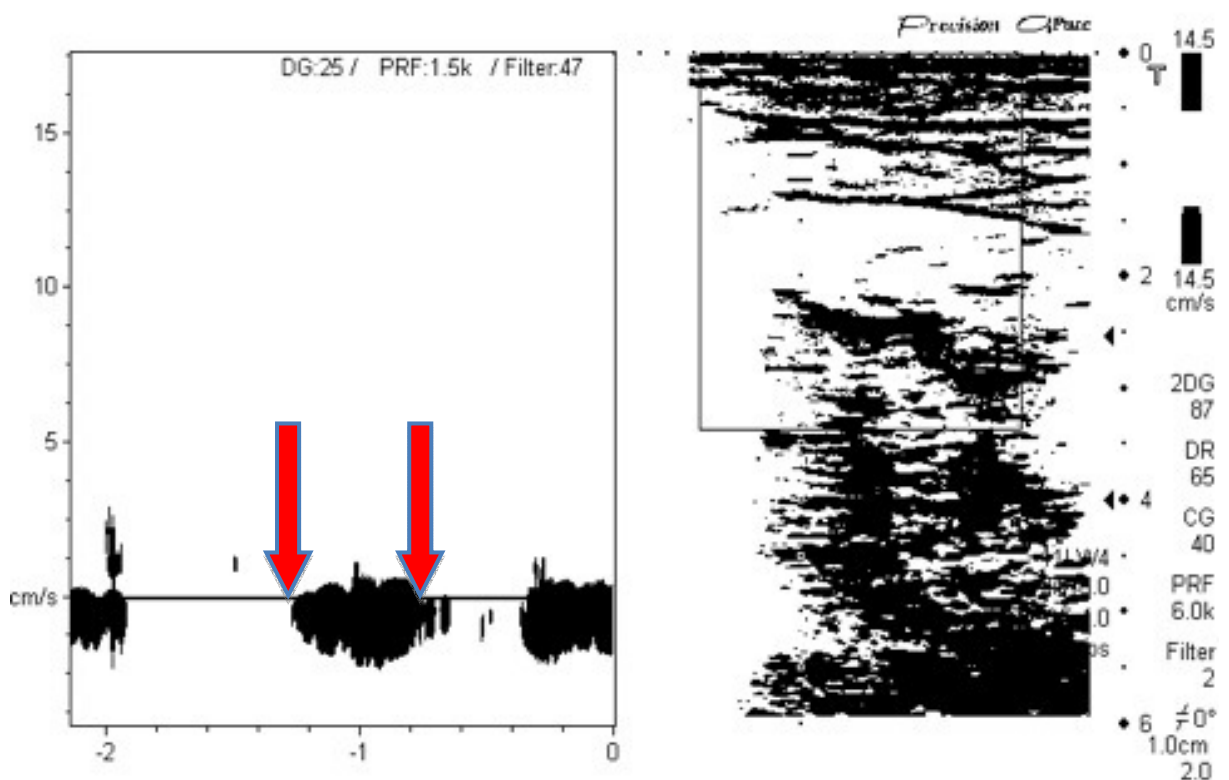


Figura 10. Imagen de la curva eco-doppler transformada en binario. Las flechas rojas señalan el comienzo y el final del área seleccionada de la curva estudiada.

Una vez se obtuvo la imagen en binario, se realizó una calibración de la escala para el eje X y para el eje Y. Posteriormente y ampliando la imagen se seleccionaron 30 puntos representativos de la curva que se dibuja tanto por encima como por debajo del eje X. Cada punto representativo tiene una coordenada en el eje X y otra en el eje Y. De este modo se trazó una curva tanto por encima como por debajo del eje X con valores absolutos para cada uno de los sujetos estudiados. Una vez que se recogieron estos valores, con el programa GraphPad Prism (GraphPad software, CA, USA) se calculó el área de ambas curvas. De este modo se obtuvo un parámetro que hemos llamado EcoSuma para cada sujeto sano del estudio.

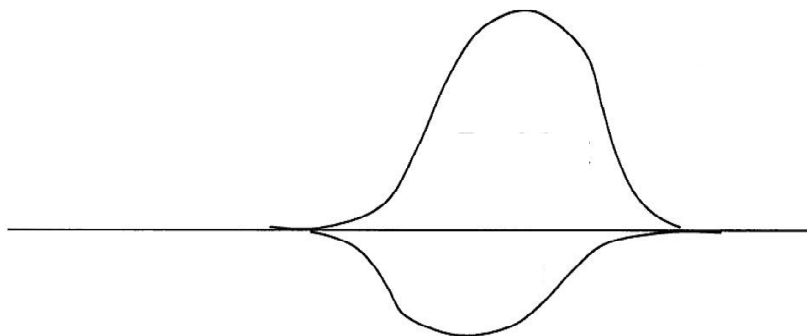


Figura 11. Esquema representativo del cálculo del parámetro EcoSuma.

4. Extracción de las muestras de sangre.

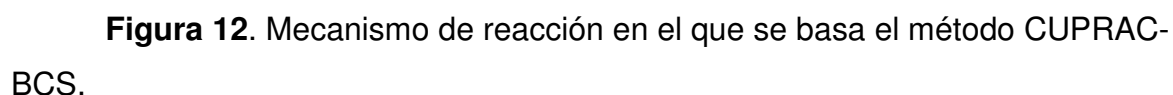
Las muestras de sangre de los sujetos de estudio se extrajeron mediante punción de la vena superficial del pliegue del codo, previa colocación de un torniquete en el brazo. Un volumen de 2. 4 mL de sangre se adicionó a tubos conteniendo 300 μ L de citrato (BD Vacutainer®, BD-Phymouth, PL6 7BP, UK) y se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

5. Preparación del plasma.

Las muestras de sangre se procesaron por centrifugación a 900 g durante 10 minutos a 4°C antes de las 4 horas posteriores a su extracción, con objeto de minimizar posibles alteraciones en los parámetros bioquímicos. El plasma obtenido se almacenó a -75°C en alícuotas de 200 μ L hasta su posterior uso.

6.1. Método CUPRAC-BCS.

Existen diferentes métodos para medir la capacidad antioxidante total (TAC) de fluidos biológicos basados en la reducción del cobre. Éstos difieren en el tipo de quelante que forma un complejo con el cobre monovalente, el cual absorbe luz entre 450-490 nm. En el método CUPRAC-BCS, los antioxidantes no enzimáticos presentes en la muestra reducen el Cu(II) a Cu(I) el cual forma un complejo con la sal disódica del ácido batocuproinedisulfónico (BCS) que absorbe la luz a 490 nm.



67

6.1.2. Protocolo experimental

El protocolo descrito por Campos et al. (2009) se modificó a efectos de diluir la muestra de plasma directamente con el tampón fosfato (KPP). Un volumen de 10 μL de plasma se mezcló con 190 μL de tampón fosfato (10 mM, pH=7.4) conteniendo 0.25 mM de BCS durante 10 s en pocillos de una placa de 96. Seguidamente, la absorbancia inicial (A_i) se midió a 490 nm en un lector de placas. Posteriormente se adicionó un volumen de 50 μL de CuSO_4 (0.5 mM, preparada en agua) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos. A continuación la absorbancia final (A_f) se volvió a medir a 490 nm. La diferencia entre A_f y A_i se empleo en el cálculo del valor TAC (Figura 14).

6.1.3. Cálculo del valor TAC.

Como antioxidante de referencia se usó el trolox. Se preparó una recta estándar con diferentes concentraciones de trolox (0, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mM) y después de la reacción descrita para las muestras, la absorbancia se midió a 490 nm. El valor TAC de las muestras de plasma se expresó en mmoles de trolox/L usando la recta estándar de trolox.

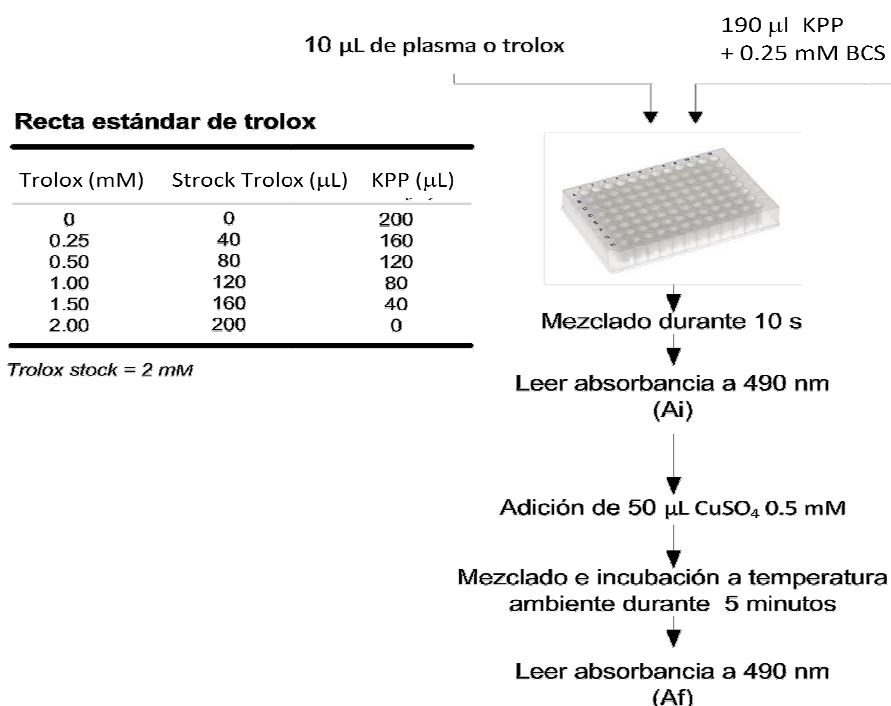


Figura 13. Esquema del protocolo experimental del método CUPRAC-BCS.

(Adaptado de Campos et al. 2009)

6.2. Método SOSA.

6.2.1. Fundamento.

El método SOSA (*Superoxide Anion Scavenging Activity*) está basado en la inhibición de la luminiscencia, producido por el anión superóxido, por antioxidantes de alto peso molecular presentes en la muestra siempre y cuando ésta sea previamente dializada > 10 kDa. El sistema xantina oxidasa/hipoxantina (HX) es usado para producir *in situ* anión superóxido. En este método la coelenterazina (CTZ) -un antioxidante natural- es usada como sonda de detección de anión superóxido debido a su especificidad. La CTZ es oxidada para producir un anión excitado -la coelenteramida (CTA)- que emite luz azul (Figura 15).

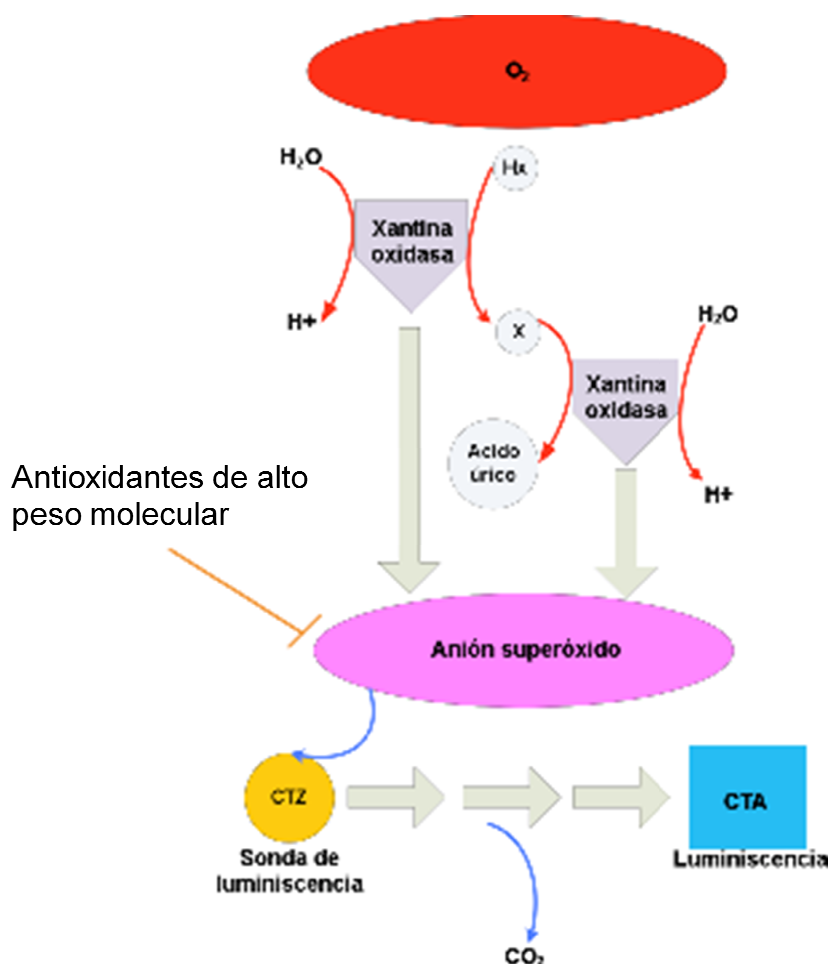


Figura 14. Mecanismo de reacción en el que se basa el método SOSA.

(Adaptado de Saleh and Plieth, 2010)

6.2.2. Protocolo experimental.

El protocolo SOSA descrito por Saleh y Plieth (2010) se modificó para ser adaptado a un lector de placas (Luminómetro de placas GloMax® 96), cambiando el orden de adición de los reactivos. En primer lugar se adicionó la muestra/blanco/SOD seguido por la adición de la sonda de luminiscencia (CTZ), la XO y finalmente el sustrato HX. Después de 30 segundos de reacción a temperatura ambiente se midió la señal de luminiscencia en un luminómetro de placa. La reacción se llevó a cabo con KPP (100 mM, pH=7.4), el cual se usó para disolver la SOD, diluir la muestra y la sonda de luminiscencia. Para disolver la XO y la HX se utilizó KEPT (0.4% v/v Triton + 0.1 mM EGTA en KPP).

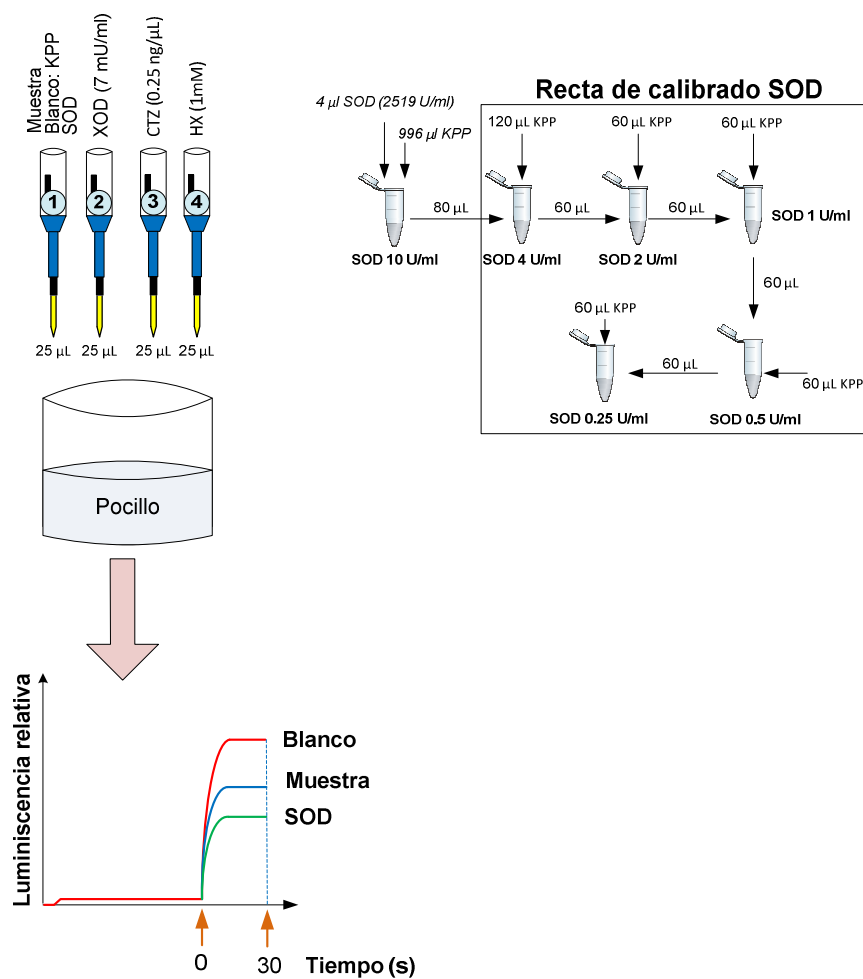


Figura 15. Esquema del protocolo experimental del método SOSA. 1,2,3,4 es el orden de adición de los reactivos.

(Adaptado de Saleh y Plieth, 2010)

6.2.3. Cálculo del valor SOSA

Los valores de luminiscencia de las muestras/SOD se convirtieron a valores de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{inhibición de luminiscencia} = 1 - \frac{\text{Luminiscencia}_{\text{muestra/SOD}}}{\text{Luminiscencia}_{\text{blanco}}} \quad (1)$$

El valor SOSA de la muestras se expresó en mU SOD/mg de proteína estimada a partir de la recta de calibrado de SOD (inhibición de luminiscencia *versus* log SOD) y el contenido de proteína de las muestras medida por el micro-método de Bradford descrito en la sección 10.

6.3. Cuantificación de tioles totales.

6.3.1. Fundamento.

El contenido de tioles totales se cuantificó empleando el reactivo de Ellman (5,5-ditiobis (2-nitro ácido benzoico), DNTB) descrito para placas de 96 pocillos (Hawkins et al 2009). Los grupos tioles presentes en las proteínas o en compuestos de bajo peso molecular, reaccionan con el DTNB y producen el TNB el cual puede ser cuantificado a 412 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (Figura 16).

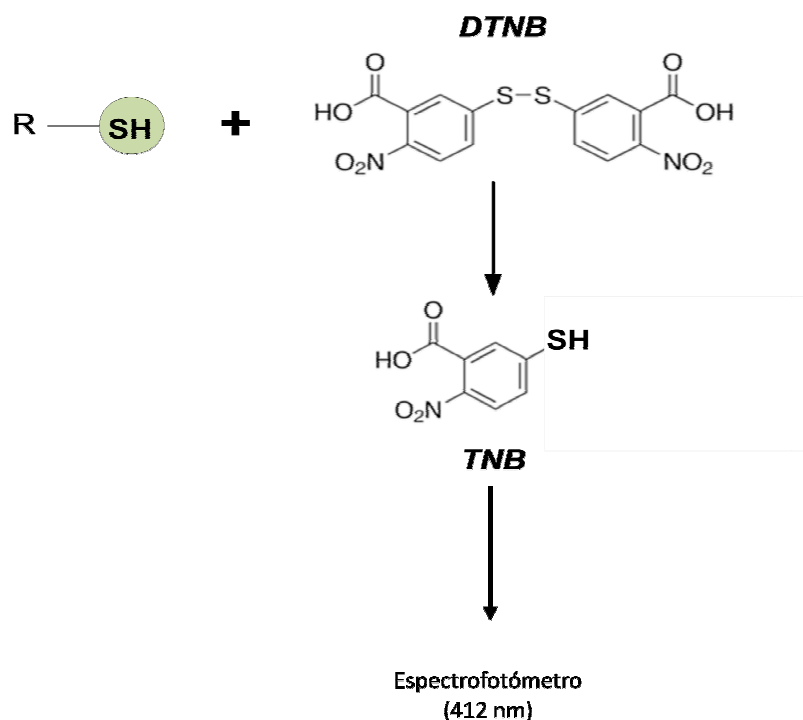


Figura 16. Mecanismo de reacción entre grupos tioles y el DTNB.

(Adaptado de Hawkins et al. 2009).

6.3.2. Protocolo experimental

Se utilizó GSH como sustancia patrón para realizar una curva estándar. En una placa de 96 pocillos se cargó un volumen de 10 μL de disoluciones de glutatión reducido (GSH) como curva estándar (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM) y de plasma por duplicado. A continuación se adicionó 200 μL de DNTB (0.5 mM en tampón fosfato) a cada pocillo que contenía las muestras de plasma preparado con 200 μL de tampón fosfato (100 mM, pH=7.4) con una micropipeta multicanal. Como controles negativos se incluyó la misma muestra de 10 μL de plasma y 200 μL de tampón fosfato (100 mM, pH=7.4) para corregir la contribución al valor de absorbancia de las muestras de plasma. Se agitó la placa, protegida de la luz, en un agitador 3D durante 1 minuto y seguidamente se incubó la mezcla a temperatura ambiente

durante 30 minutos en oscuridad. Al cabo de este tiempo, la absorbancia a 412 nm se leyó en un lector de placas multiusos Synergy HT™.

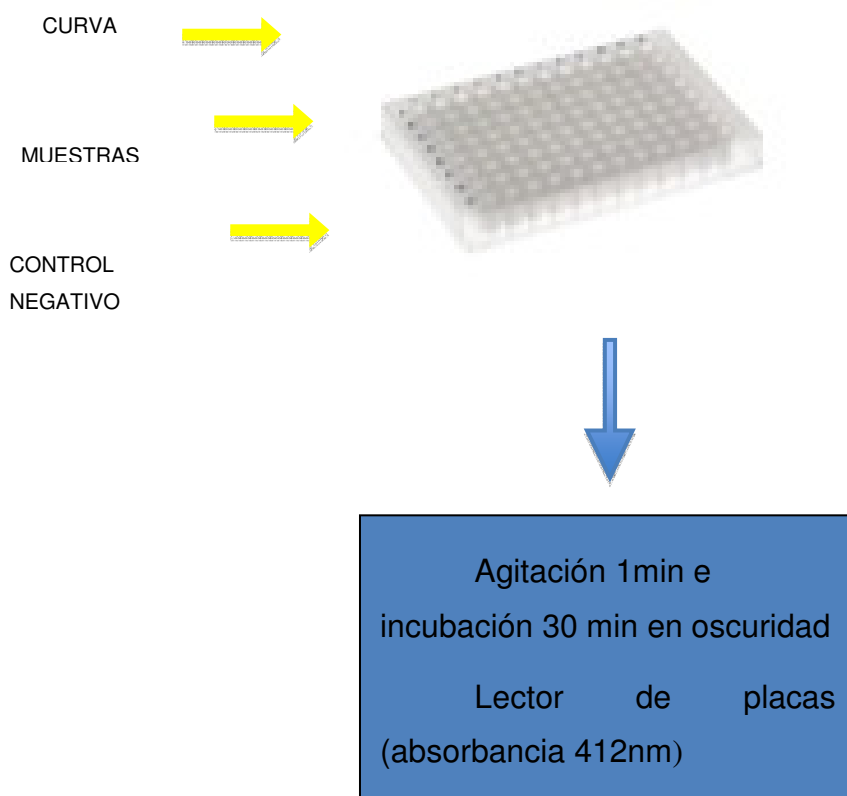


Figura 17. Esquema del protocolo experimental del método tioles.

6.3.3. Cálculos

El nivel de tioles totales se expresó en mM GSH /mg de proteína, el cual se estimó a partir de la recta de calibrado del GSH y del contenido de proteína del plasma medido según el micro-método de Bradford descrito en la sección 11.

6.4. Determinación de la actividad catalasa

6.4.1. Fundamento

La actividad de la catalasa se cuantificó empleando el método fluorimétrico basado en la oxidación a resorufina de la sonda Amplex Red en presencia de HRP y H_2O_2 . La catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y por lo tanto es capaz de reducir la oxidación de la sonda (Figura 7).

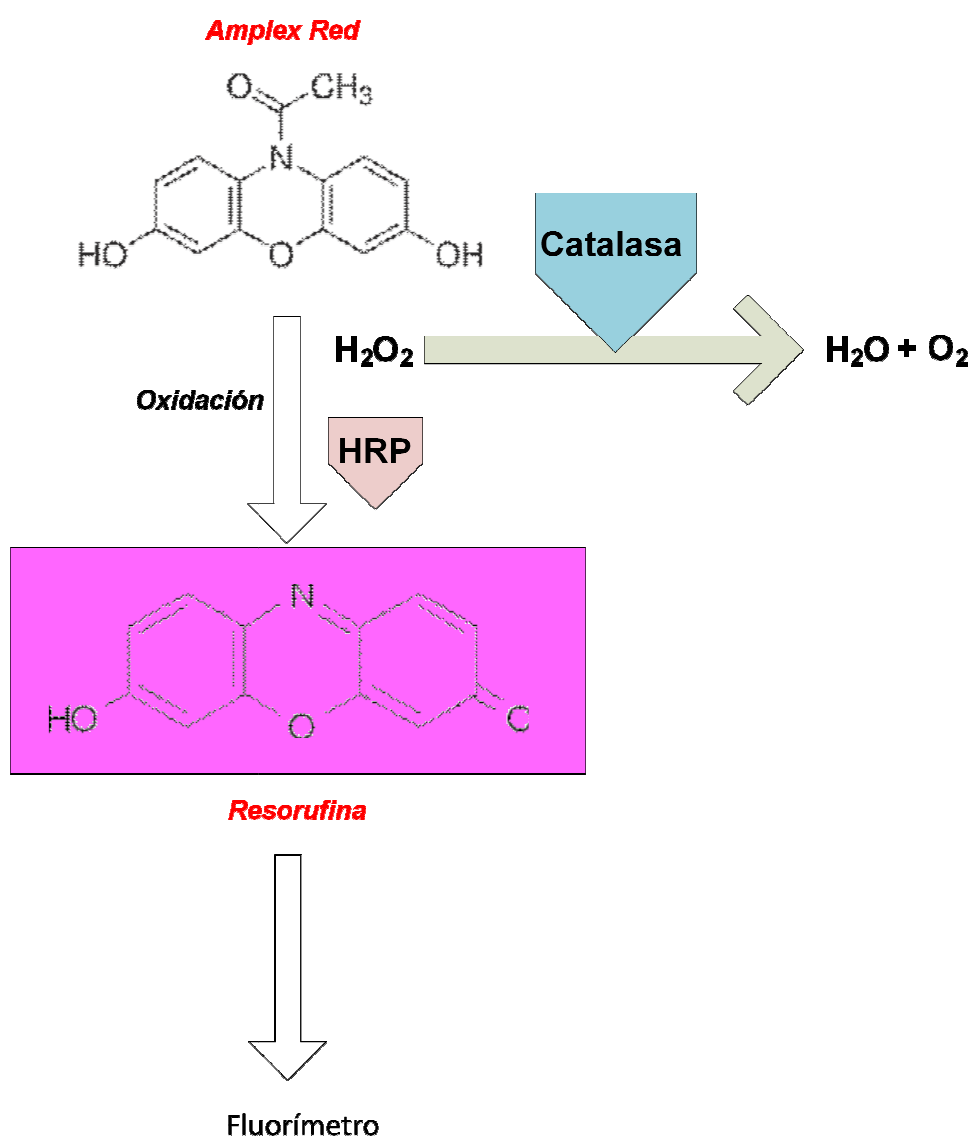


Figura 18. **Esquema de reacciones implicadas en la determinación de la actividad catalasa mediante la oxidación del Amplex Red.**

6.4.2 Protocolo experimental.

Se utilizó como sustancia patrón la catalasa. Se mezclaron 25 μL de plasma diluido, blanco o catalasa (0-0.4 U/mL) con un volumen igual de H_2O_2 y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se adicionó, con una micropipeta multicanal, 50 μL del reactivo Amplex Red en cada uno de los pocillos. Inmediatamente después, la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego, previa agitación media durante 3 s en el lector de placa, se leyó la señal de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$) en un lector de placas multiusos Synergy™ HT.

Reactivo AR-CAT

- 50 μL del stock de Amplex red (10 mM disuelto en dimetilsulfóxido)
- μL del stock de HRP (100 U/mL disuelto en agua)
- 4930 μL de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.5).

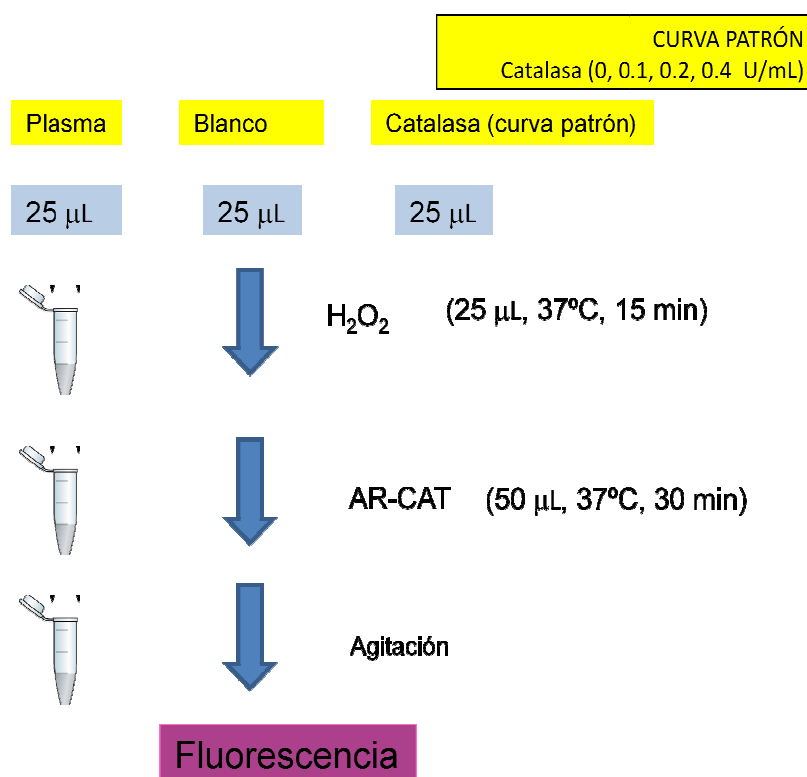


Figura 19. Esquema del protocolo experimental usado para medir actividad de catalasa.

6.4.3 Cálculos

La actividad catalasa plasmática se expresó en U/mg proteína, estimada a partir de la recta de calibrado de la catalasa según el protocolo experimental descrito. La recta estándar se obtuvo por análisis de regresión lineal de los datos de inhibición de la fluorescencia obtenida según la ecuación 5 *versus* la concentración de catalasa en U/mL. El contenido de proteína de las muestras de plasma se midió mediante el micro-método de Bradford descrito en la sección 11.

$$\text{inhibición de fluorescencia} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia}_{\text{muestra/catalase}}}{\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}} \quad (2)$$

$$FL_{\text{residual}} = FL(\text{blanco}) - FL(\text{catalasa}) \quad (5)$$

Donde: $\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}$ es la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25$ nm y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35$ nm) en ausencia de catalasa.

7. Cuantificación de proteínas carboniladas totales

7.1 Fundamento

La cantidad de proteínas plasmáticas carboniladas se midió de acuerdo al método basado en la dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Hawkins et al., 2009). La DNPH reacciona con grupos carbonilos formados en la proteínas mediante procesos oxidativos (Figura 1). El compuesto formado es capaz de absorber a 370 nm y ello constituye una medida de la cantidad de carbonilos presente en la proteína de una muestra biológica.

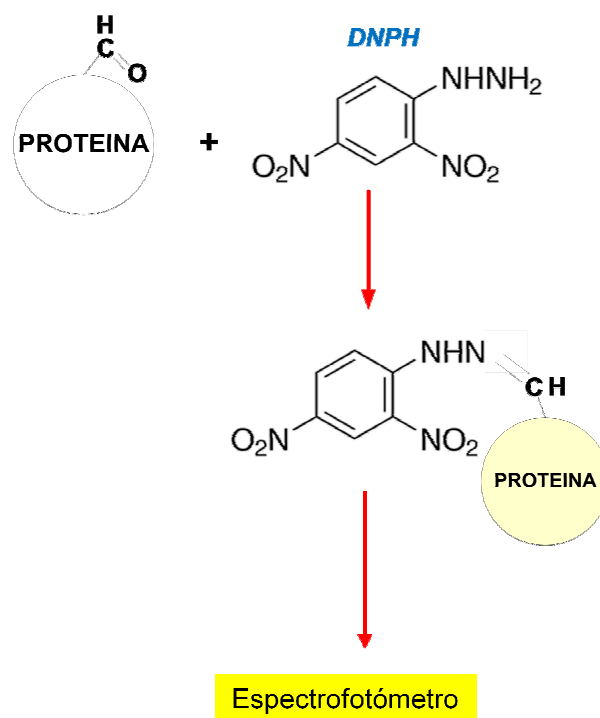


Figura 20. Esquema de reacción entre grupos carbonilos proteicos y la DNPH (Adaptado de Hawkins y col. 2009).

7.2. Protocolo experimental

Se mezclaron 25 μL de plasma con igual volumen de DPNH (10 mM, disuelto en HCl 2.5 M) en tubos eppendorf. Seguidamente la mezcla se incubó a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 15 minutos. Cada 5 minutos los tubos se agitaron intensamente en un vortex para favorecer la reacción entre los grupos carbonilos y la DNPH. Las proteínas plasmáticas totales se precipitaron en frío con TCA (10% p/v) durante 30 minutos. Mediante centrifugación a 2100 g x 30 min (4°C), se obtuvieron los pellets proteicos, los cuales se lavaron y centrifugaron, a las mismas condiciones, dos veces con una mezcla fría de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v) para eliminar el exceso de DNPH. A continuación los pellets se disolvieron en guanidina-HCl (6M), las proteínas solubilizadas se transfirieron a una placa de 96

pocillos y se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de placas multiusos Synergy™ HT .

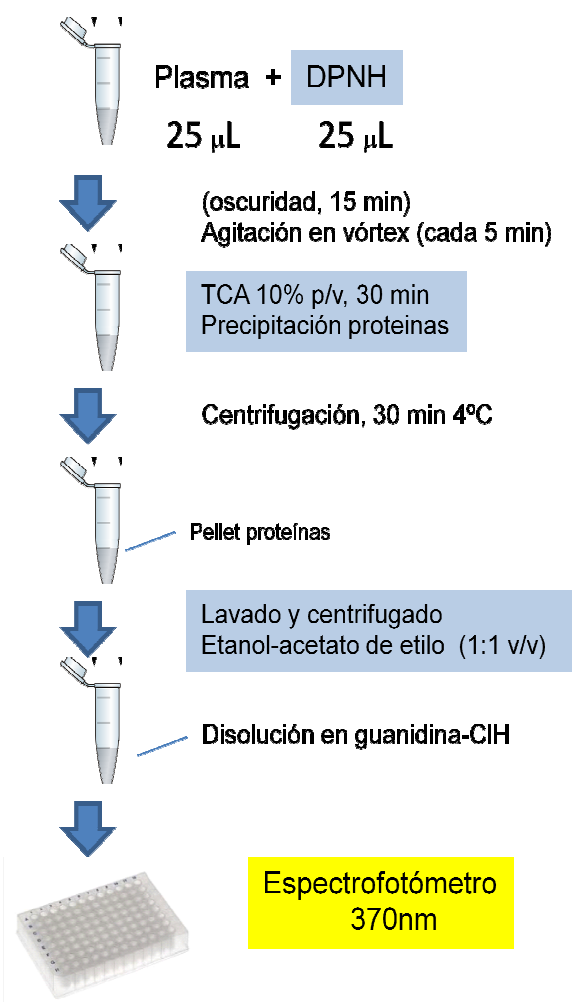


Figura 21. Protocolo experimental sobre el cálculo de carbonilos.

7.3. Cálculos

La concentración de proteínas plasmáticas carboniladas se determinó mediante las ecuaciones 3 y 4.

$$Proteinas\ carboniladas\ totales\ \left(\frac{nmol}{ml}\right) = \left[\frac{A_{370\ nm}}{\epsilon_{DPNH} \times b}\right] \times 10^6 \quad (3)$$

$$\text{Proteínas carboniladas totales} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg proteína}} \right) = \left[\frac{\text{Proteínas carboniladas totales} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right)}{\text{Contenido de proteínas de la muestra} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \right] \quad (4)$$

Donde: $\epsilon_{\text{DNPH}} = 22\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, es el coeficiente de extinción del DNPH, $A_{370 \text{ nm}}$ es la absorbancia a 370 nm y b es el paso o altura del líquido en el pocillo.

8. Cuantificación de 3-nitrotirosina.

8.1. Fundamento.

Los niveles de 3-nitrotirosina plasmática se detectó mediante *Dot blot* (Figura 22). Las proteínas de la muestra son fijadas a una membrana con alta afinidad por estas, seguidamente la membrana es incubada sucesivamente con un anticuerpo primario específico y con otro secundario que lleva conjugado el sistema enzimático de detección (HRP). La 3-nitrotirosina es el producto de la nitración de tirosina por peroxinitrito y es un marcador en diferentes patologías relacionadas con situaciones de estrés oxidativo.

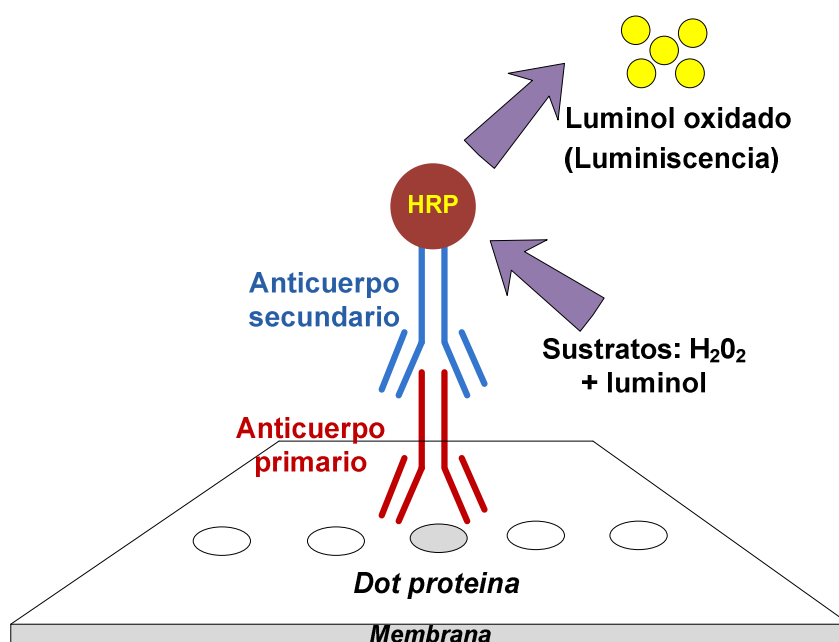


Figura 22. Detección de proteínas mediante *Dot Blot*.

8.2. Protocolo experimental

Se cargaron 0.1 µg de plasma sobre una membrana de PVDF previamente acondicionada con el objeto de maximizar su capacidad de *binding*. A continuación la membrana se incubó con MemCode™, un colorante reversible de tinción de proteínas y previo a incubaciones sucesivas con disoluciones para reducir el fondo, se escaneó para tener el control de carga de proteína de cada muestra individual. Luego, utilizando la disolución de borrador, incluido en el Kit MemCode™ se eliminó completamente el colorante. Seguidamente, la membrana se bloqueó con una disolución sin proteína (SurModic) a temperatura ambiente durante 1 hora bajo agitación lenta (“movil rod”, J. P. Selecta S.A, Barcelona, España). Inmediatamente después, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-3-nitrotirosina (dilución 1:1400) durante 50 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces con tampón TBST (2 mM Tris, 500 mM NaCl and 0.1% v/v tween 20, pH 7.5) y una vez con TBS. A continuación la membrana se volvió a incubar pero esta vez con el anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa (dilución 1:2000) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavó del mismo modo que se hizo después de la aplicación del anticuerpo primario. Para el revelado, la membrana se incubó durante 2 minutos en un cuarto oscuro con el reactivo de quimioluminiscencia recién preparado (0.2 mM ácido cumárico, 2.5 mM luminol and 2.7 mM peróxido de hidrógeno en 1M Tris-HCl pH 8.5) y la señal de luminiscencia se registró sobre una película de autoradiografía. La película se escaneó usando un escaner comercial (hp scanjet 2400).

8.3. Cálculos

Los niveles de 3-nitrotirosina se cuantificaron con el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) midiendo el parámetro de densidad integrada de los *dots* y normalizándolas con respecto a la cantidad total de proteínas medida por tinción con MemCode™.

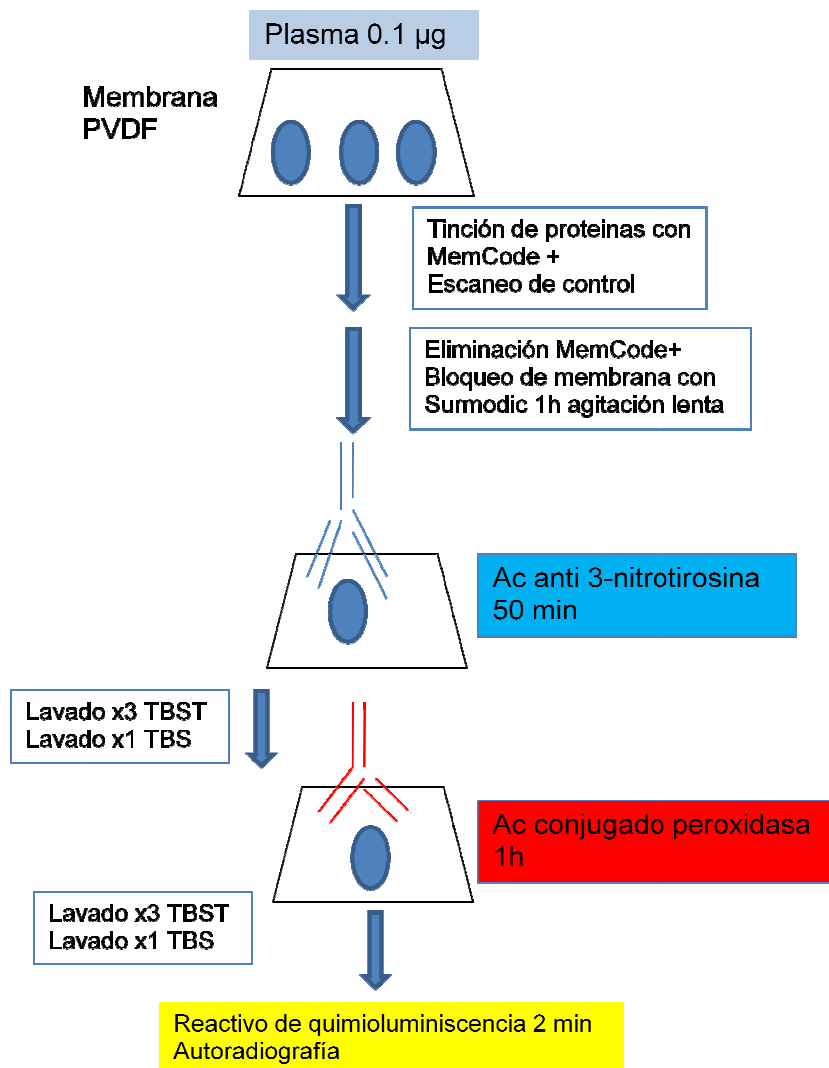


Figura 23. Esquema del protocolo experimental para la detección de 3 nitrotirosina.

9. Cuantificación de nitritos

9.1. Fundamento

La cuantificación de los niveles de nitritos plasmáticos se midió mediante la reacción de Griess. Por ello, los nitratos se redujeron químicamente en presencia de cloruro de vanadio saturado a nitritos. En condiciones ácidas, los nitritos reaccionan

con la sulfanilamida y producen un ión diazonium. Este ión se acopla a la n-Naftil-etilendiamina y generan un compuesto azo cromógeno que puede ser monitoreado a 540 nm.

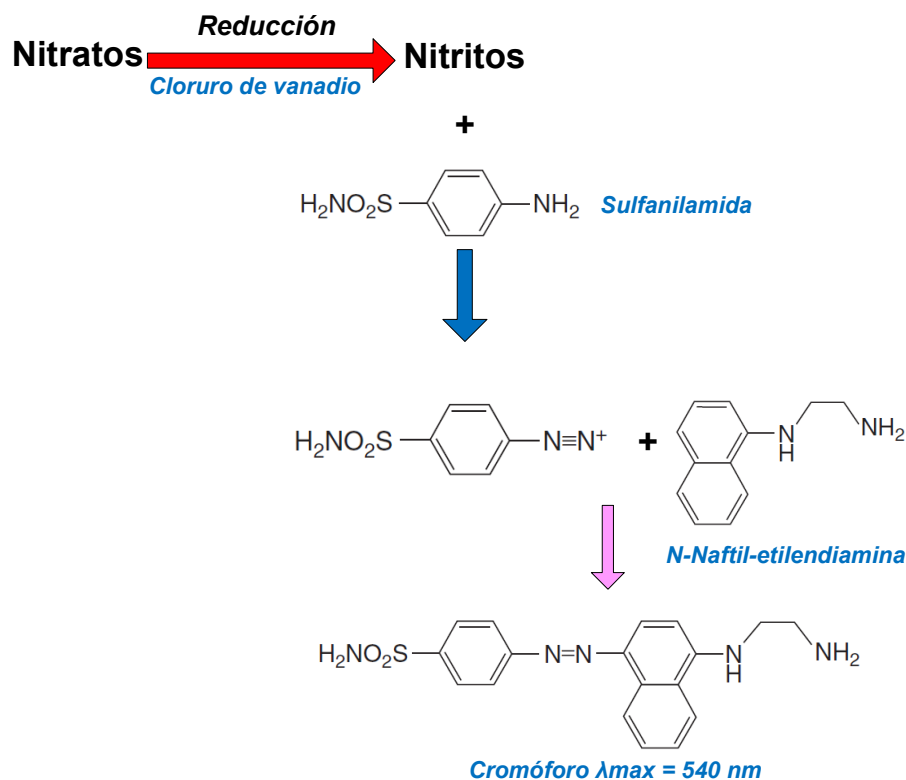


Figura 24. Esquema del principio de la reacción de Griess para la cuantificación de nitritos.

(Adaptado de Giustarini et al. 2008).

9.2. Protocolo experimental

El protocolo utilizado para la cuantificación de los niveles de nitritos plasmáticos se adaptó de Giustarini (2008) y Miranda y col. (2001). Se mezcló 100 μL de plasma o estándar de nitrato (0-100 μM) con 10 μL de N-etilendiamina (150 mM) para eliminar grupos tioles que pueden interferir con la reacción de Griess. A continuación se adicionó 110 μL de TCA (20% p/v) a la mezcla anterior y se incubó en hielo durante 5 minutos para precipitar las proteínas plasmáticas. Se mezcló 50 μL del

sobrenadante obtenido por centrifugación a 12000 g durante 5 minutos a 4°C en una placa de 96 pocillos con 50 μ L cloruro de vanadio (saturado disuelto en HCl 1 M), 25 μ L sulfanilamida (2% p/v disuelto en HCl al 5% v/v) y 25 μ L N-naftil-etilendiamina (0.1% p/v disuelto en agua). La mezcla se incubó a 37°C durante 1 h y se leyó la absorbancia a 540 nm en un lector de placas multiusos Synergy™ HT.

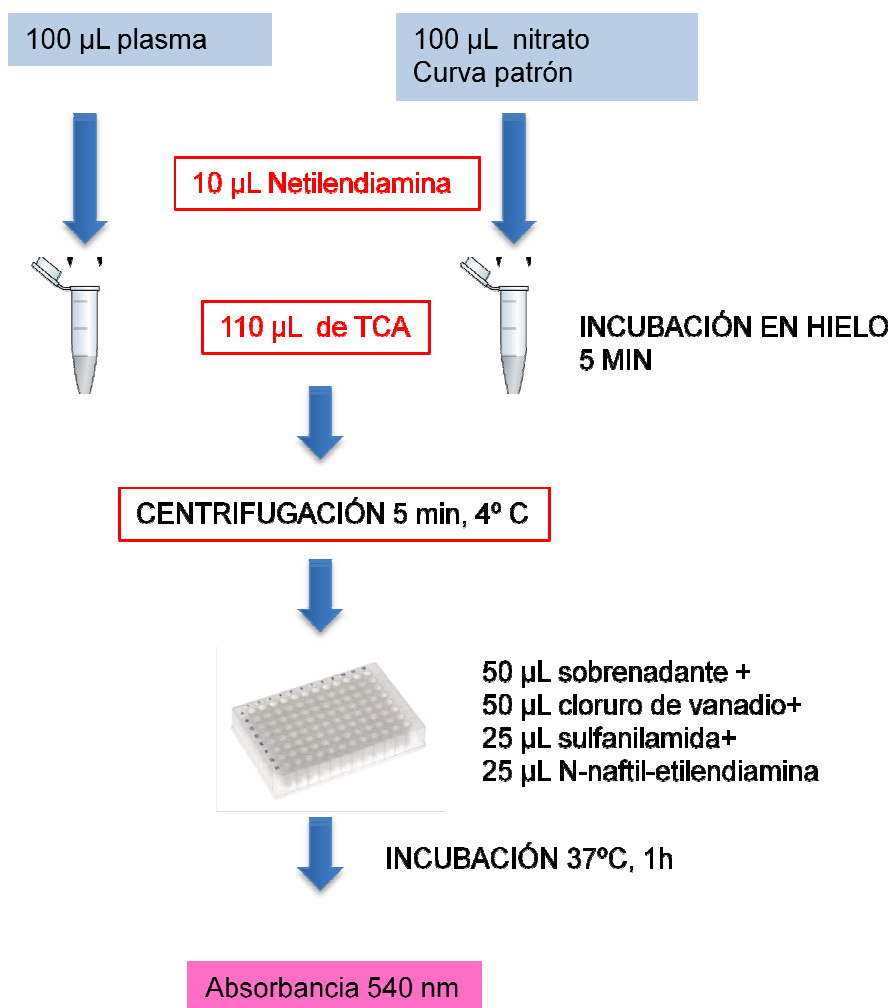


Figura 25. Esquema de protocolo experimental para la detección de nitritos.

9.3. Cálculos

El contenido de nitritos plasmáticos se expresó en μ M de nitritos estimado a partir de la recta de calibrado descrito en el protocolo experimental.

10. Determinación del contenido de proteínas.

El contenido de proteínas de las muestras de plasma se midió empleando el método de Bradford adaptado a un lector de placa. De acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, 10 μL de muestra diluida se hizo reaccionar con 200 μL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 5 veces y después de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, Rochester, VT, USA). La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se estimó a partir de una recta de calibración con albumina de suero de bovino en el rango de 0.1-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

11. Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como el promedio y su correspondiente error estándar de la media como medida de dispersión. El test de *t-student* y las prueba de comparación de medias de *Bonferroni*, así como los análisis de regresión y correlación lineal se realizaron en el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad software, CA, USA).

RESULTADOS

A. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.

1.A Inclusión de pacientes.

Se examinaron un total de 22 sujetos con actividades laborales en bipedestación y sedestación. El total de los sujetos con actividad laboral en bipedestación fue de 11 y el total de los sujetos con actividad en sedestación fue de 11.

Todos los sujetos respondieron a un cuestionario sobre sus datos personales, e historia clínica personal y se les entregó un consentimiento informado (anexo 1). Antes de ser seleccionados para este estudio, se les realizó un eco-doppler venoso de las extremidades inferiores para determinar la presencia o ausencia de enfermedad venosa según los criterios expuestos en el apartado de Material y Métodos. Se excluyeron a todos aquellos con enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (EAEO) como obesidad, hipertensión, diabetes o tabaquismo además de, gestación, infecciones recientes o antecedente de cáncer.

Las características demográficas y clínicas de los sujetos incluidos en el presente estudio se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Datos demográficos y clínicos de los sujetos experimentales.

	<i>Bipedestación</i>	<i>Sedestación</i>
<i>Sexo</i>	V= 1 M =10	V = 4 M= 7
<i>Edad</i>	35.18 (44/26)	34.09 (53/19)
<i>CEAP</i>	0 (100%)	0 (100%)
<i>Enfermedades asociadas con estrés oxidativo.</i>	0 (100%)	0 (100%)

V: Varones; M= Mujeres. Entre paréntesis se muestran los intervalos de edad y los porcentajes

B. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

Teniendo en cuenta estudios previos sobre el estado antioxidante realizados en sujetos con enfermedad venosa, hemos determinado la capacidad antioxidante de las muestras de plasma de esta Tesis mediante los siguientes ensayos:

capacidad antioxidante total con el método CUPRAC-BCS (figura 26), la actividad antioxidante frente a anión superóxido (figura 27), la actividad de la catalasa (figura 28) y los tioles totales (figura 29).

Con respecto a la capacidad antioxidante total, método CUPRAC-BCS, los resultados no mostraron diferencias significativas en este parámetro plasmático entre individuos con actividad laboral en bipedestación en comparación con individuos que ejercen su actividad laboral en sedestación (figura 26).

En siguiente parámetro analizado es la capacidad antioxidante del plasma frente al anión superóxido o método SOSA (figura 27). Con este parámetro detectamos los antioxidantes de alto peso molecular, entre ellos enzimas como la SOD. El plasma de individuos que trabajan en bipedestación y sedestación no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a este parámetro.

Además de la SOD, la catalasa es una de las principales enzimas detoxificadoras. En esta Tesis se ha determinado la actividad de esta enzima en ambos grupos de estudio (figura 28). La actividad de la catalasa en plasma mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos experimentales siendo mayor en el conjunto de los sujetos que trabajan en bipedestación.

El último parámetro determinado fueron los grupos tioles (figura 29). Éstos se encuentran en plasma en proteínas y en GSH. Los valores de los niveles de tioles totales en plasma de ambos grupos experimentales no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

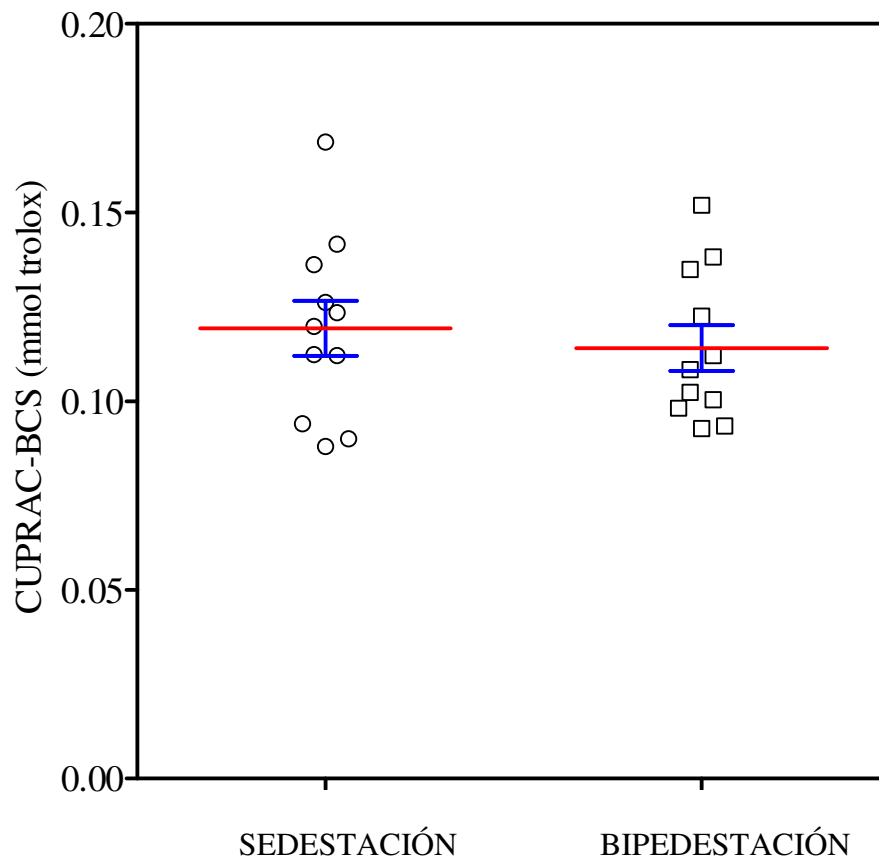


Figura 26: Comparación de la capacidad antioxidante total del plasma medida mediante método CUPRAC-BCS de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos $n=11$) o bipedestación (cuadrados, $n=11$). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

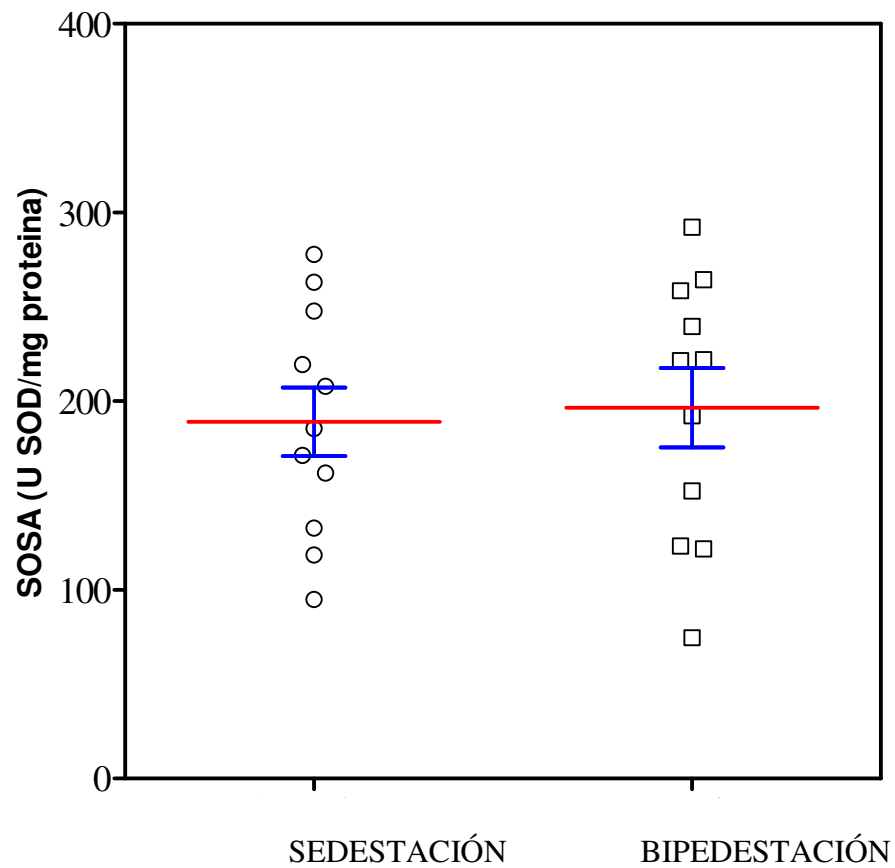


Figura 27. Comparación de la capacidad antioxidante frente a anión superóxido del plasma de de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos $n=11$) o bipedestación (cuadrados, $n=11$). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico de realizó mediante t-student.

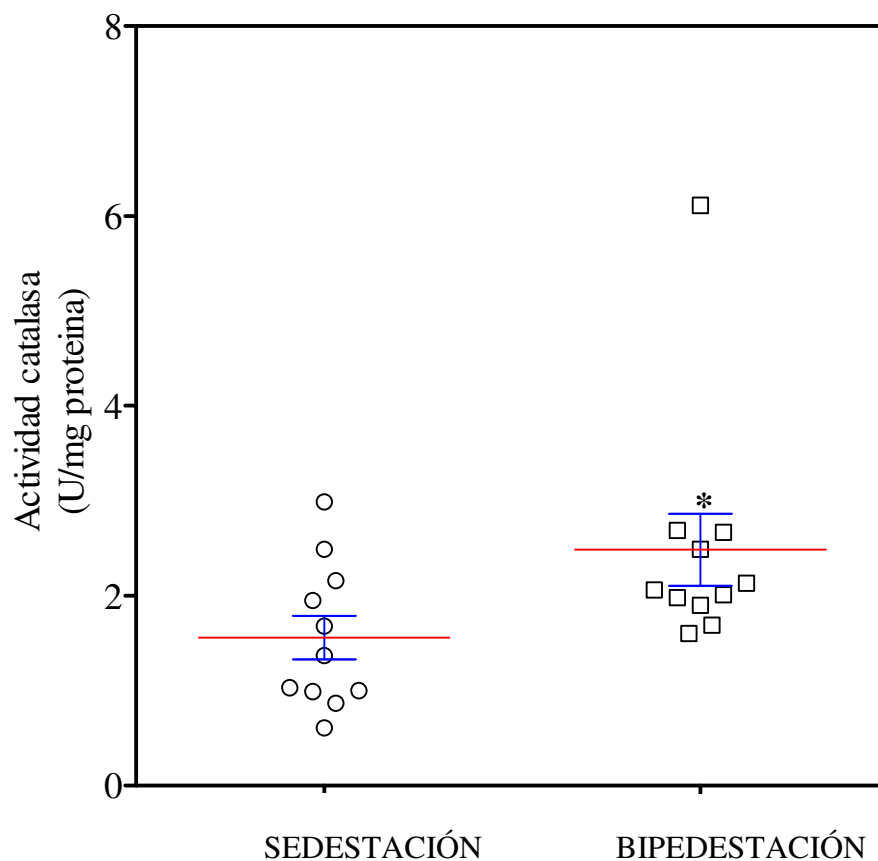


Figura 28. Comparación de la actividad de la catalasa en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos $n=11$) o bipedestación (cuadrados, $n=11$). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. * $p<0.05$ respecto individuos que trabajan en sedestación. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

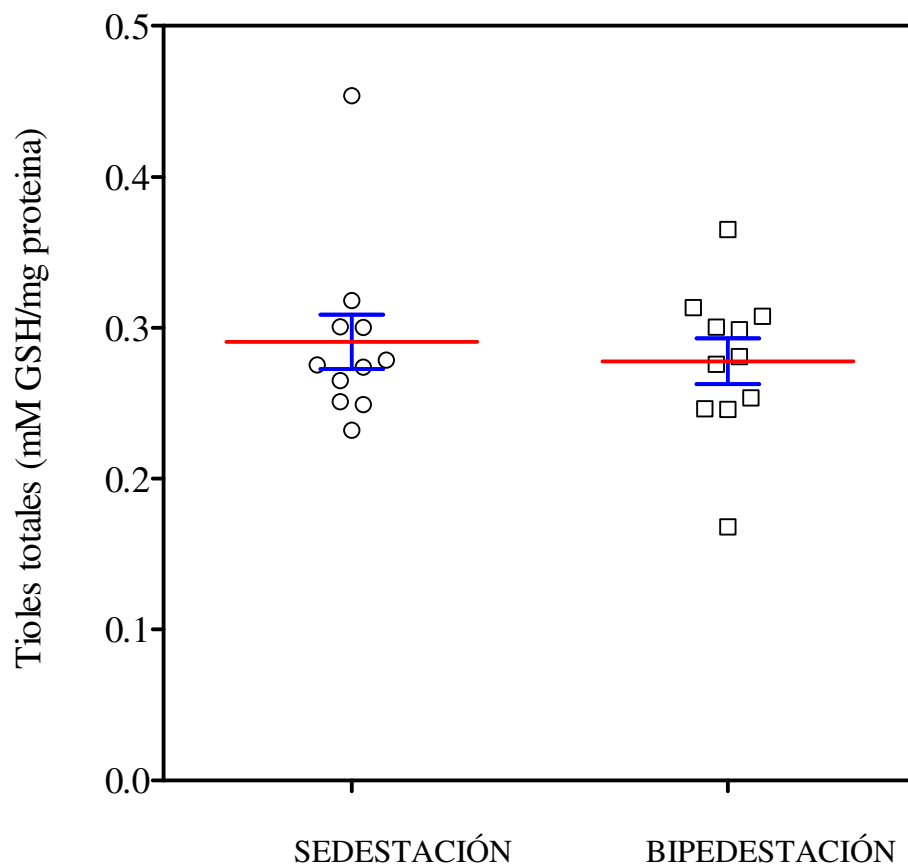


Figura 29. Comparación de los niveles de tioles en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

C. NITRITOS

Los niveles de nitratos determinados por el método de Griess mostraron diferencias con significación estadística entre ambos grupos estudiados.

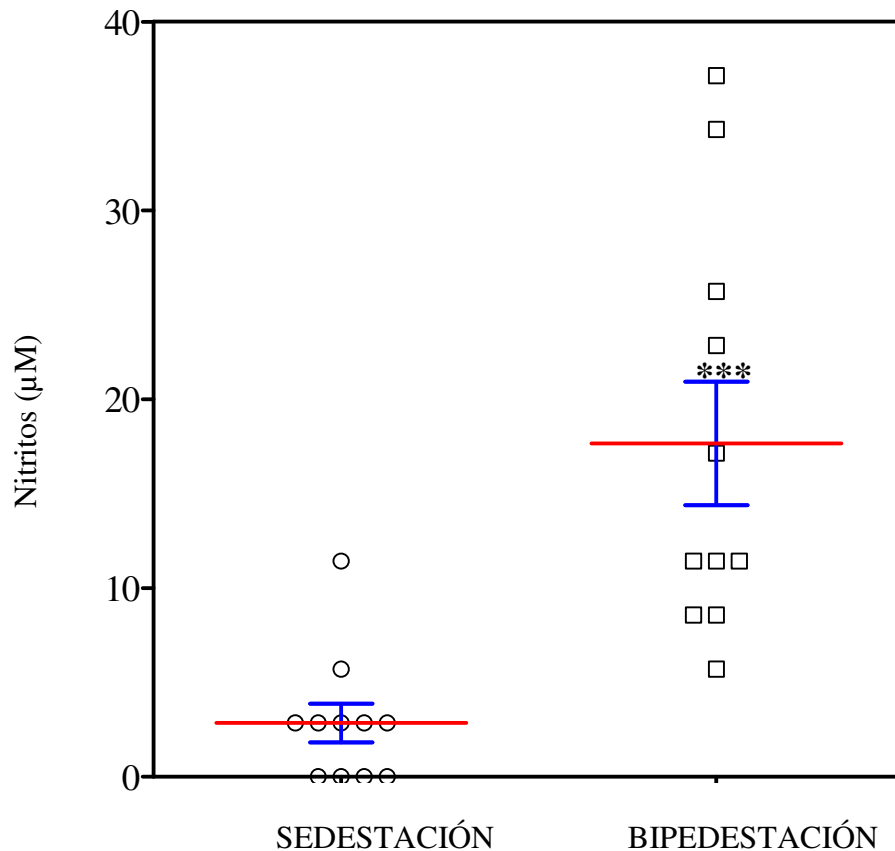


Figura 30. Comparación de los niveles de nitratos en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. ***p < 0.001 con respecto a individuos sentados. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

D. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO PLASMÁTICO. MARCADORES DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS.

Los marcadores de oxidación a proteínas estudiados fueron los carbonilos y la 3- NT. La cantidad de proteínas carboniladas (figura 31) fue similar en ambos grupos estudiados sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Los valores en los niveles de 3-NT (figura 32) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

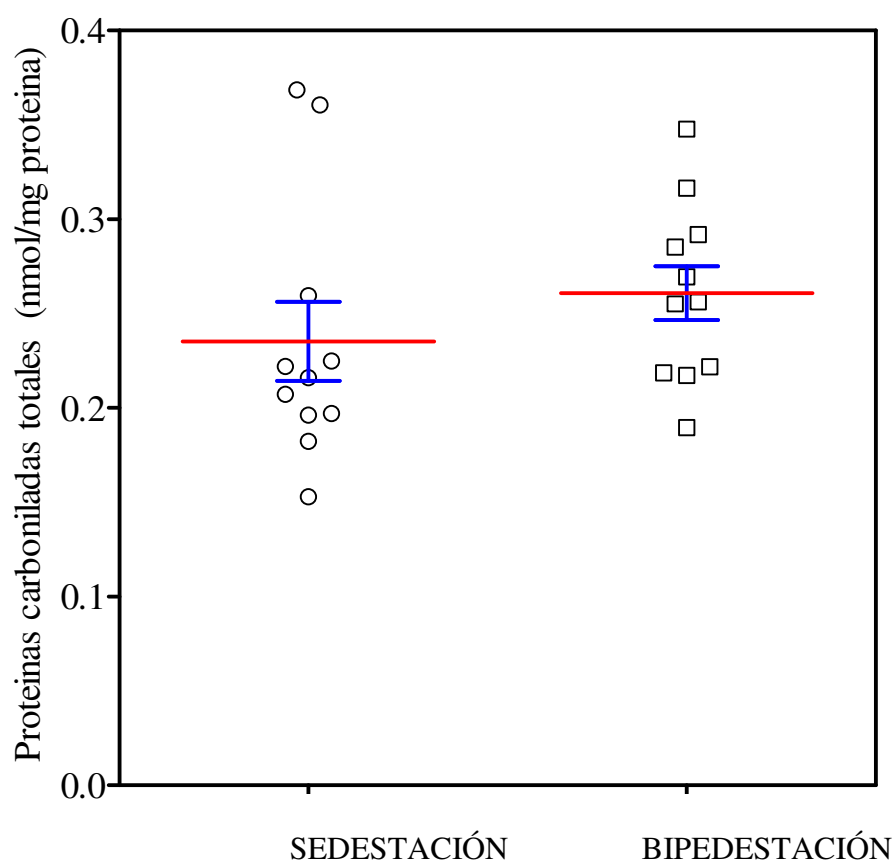


Figura 31. Comparación de los niveles de carbonilos en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

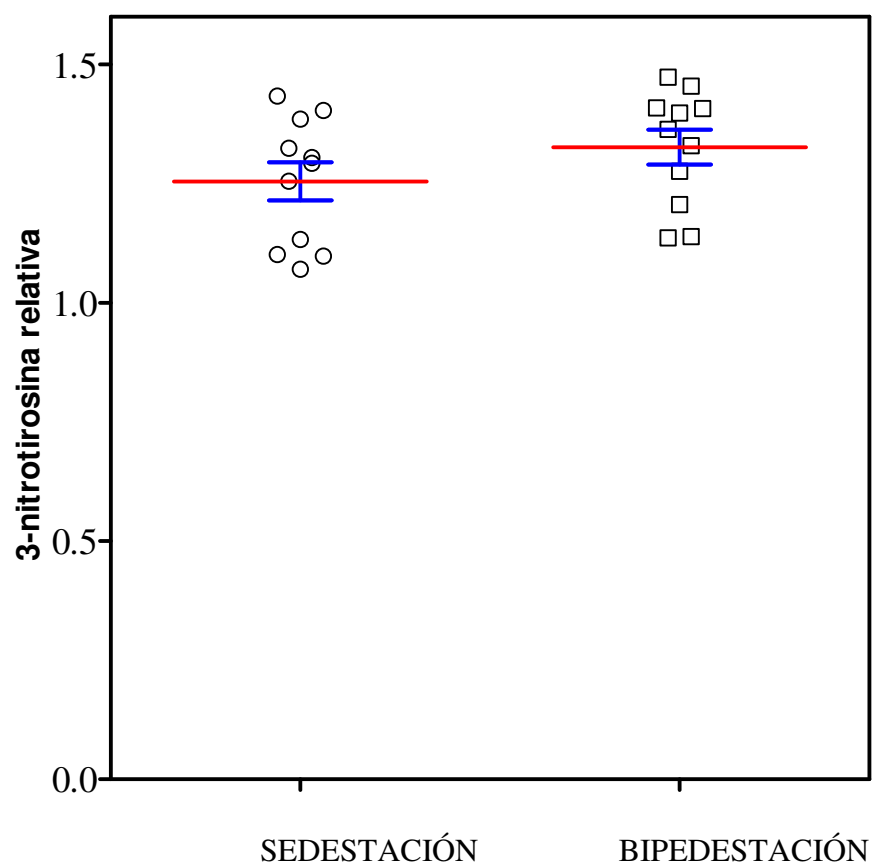
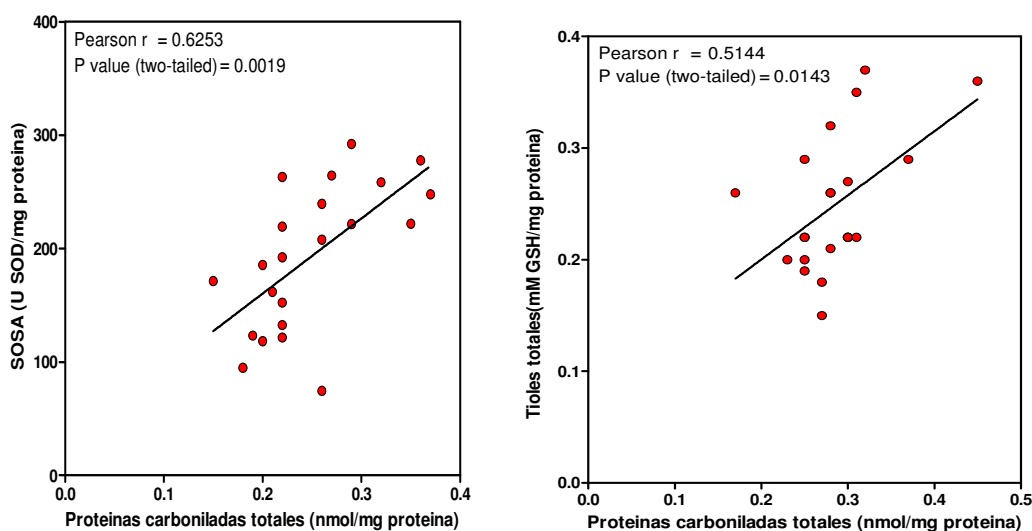


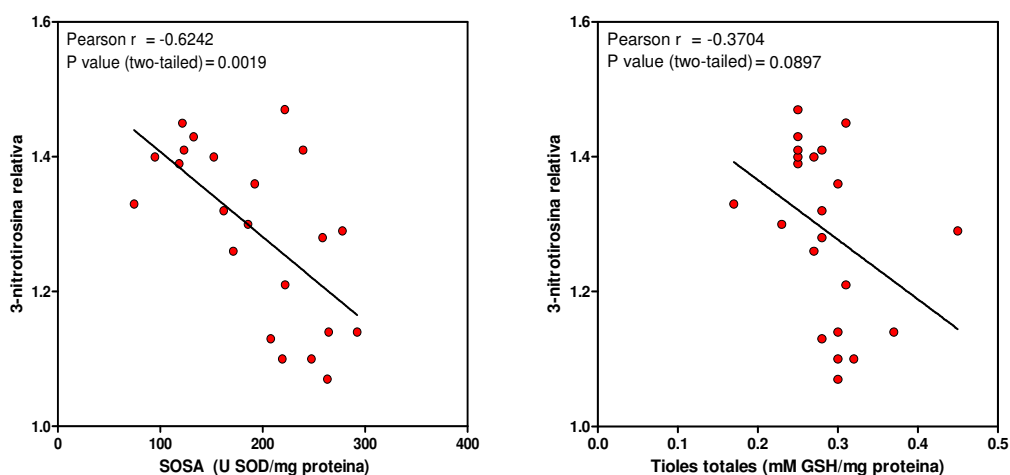
Figura 32. Comparación de los valores de 3-NT en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

E. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS Y PARÁMETROS ANTIOXIDANTES.

La relación que existe entre los distintos marcadores de oxidación de proteínas hallados en este estudio y los mecanismos antioxidantes plasmáticos, se describe en las siguientes gráficas. La relación de las proteínas carboniladas totales con los valores de SOSA y tioles totales (figura 33) es positiva y con significación estadística para una $p < 0.05$. La determinación de la 3-NT muestra una correlación negativa con los valores hallados para SOSA y tioles totales (figura 34).



Figuras 33. Correlaciones entre proteínas carboniladas totales y SOSA y proteínas carboniladas totales y tioles totales. Ambas correlaciones son positivas y con significación estadística para una $p < 0.05$.



Figuras 34. Correlaciones entre 3-NT y SOSA y 3-NT y tioles totales. Ambas correlaciones son negativas y con significación estadística para una $p < 0.05$.

F. EFECTO DE LA BIPEDESTACIÓN Y LA SEDESTACIÓN SOBRE EL PARÁMETRO ECOSUMA.

Los sujetos estudiados presentaron al examen eco-doppler color venoso ausencia de signos funcionales de insuficiencia venosa en los sistemas venosos superficial y profundo.

En el análisis estadístico no hay diferencias entre los sujetos que trabajan en bipedestación y los que trabajan en sedestación para este parámetro estudiado.

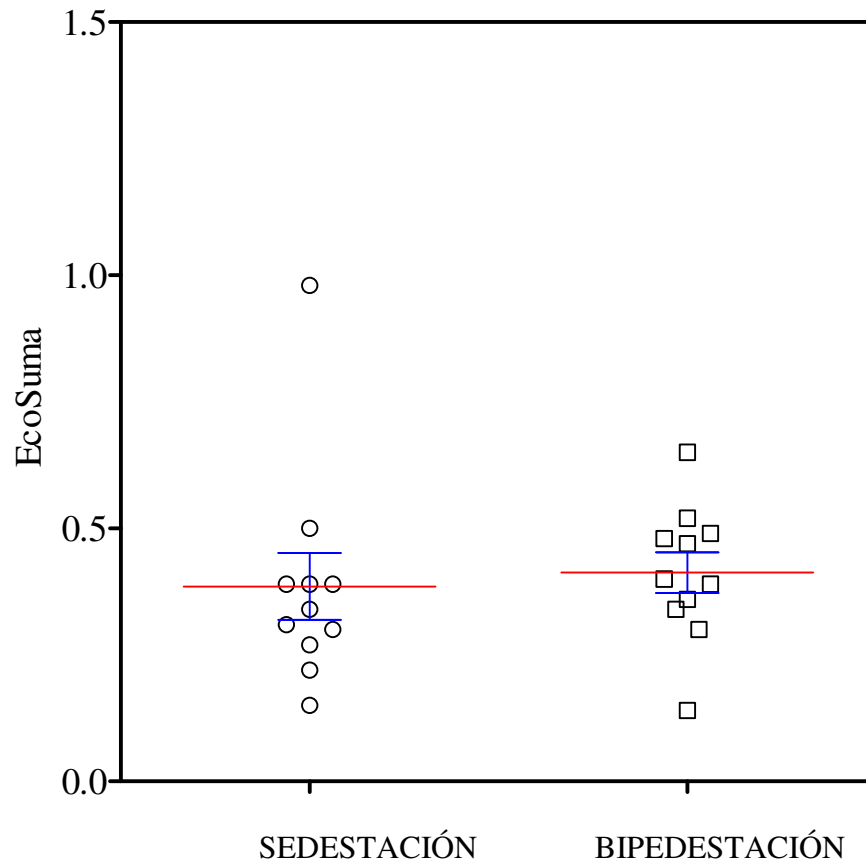


Figura 35. Comparación de los valores de EcoSuma calculados de los datos de eco-doppler para los dos grupos experimentales. Los círculos representan los valores individuales en sujetos en sedestación (n= 11) y los cuadrados los valores individuales en el grupo que trabaja en bipedestación (n= 11). Para cada grupo se representa la media +/- ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.

G. CORRELACIÓN DEL PARÁMETRO ECO-DOPPLER (ECOSUMA) CON LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS.

Se realizaron correlaciones del parámetro EcoSuma para cada individuo del estudio (tanto de los que trabajan en bipedestación como de los que trabajan en sedestación) con los distintos parámetros plasmáticos determinados.

Los datos de EcoSuma no muestran una correlación con el parámetro CUPRAC (figura 36), la actividad de la catalasa (figura 38), los tioles totales (figura 39) ni los nitritos (figura 42). Sin embargo si que existe una correlación positiva y con significación estadística con el parámetro SOSA (figura 37) y proteínas carboniladas totales (figura 40). Además, el parámetro EcoSuma muestra una correlación negativa y con significación estadística con el parámetro 3-NT (figura 32).

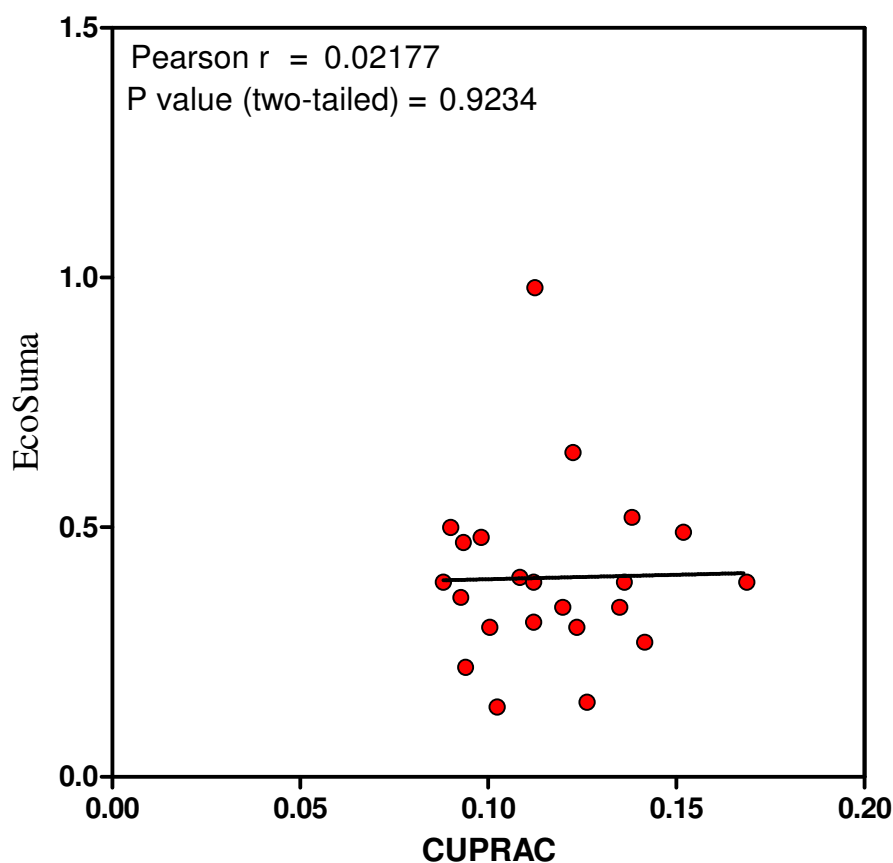


Figura 36. Correlación de los valores de EcoSuma y CUPRAC-BCS de los sujetos del estudio.

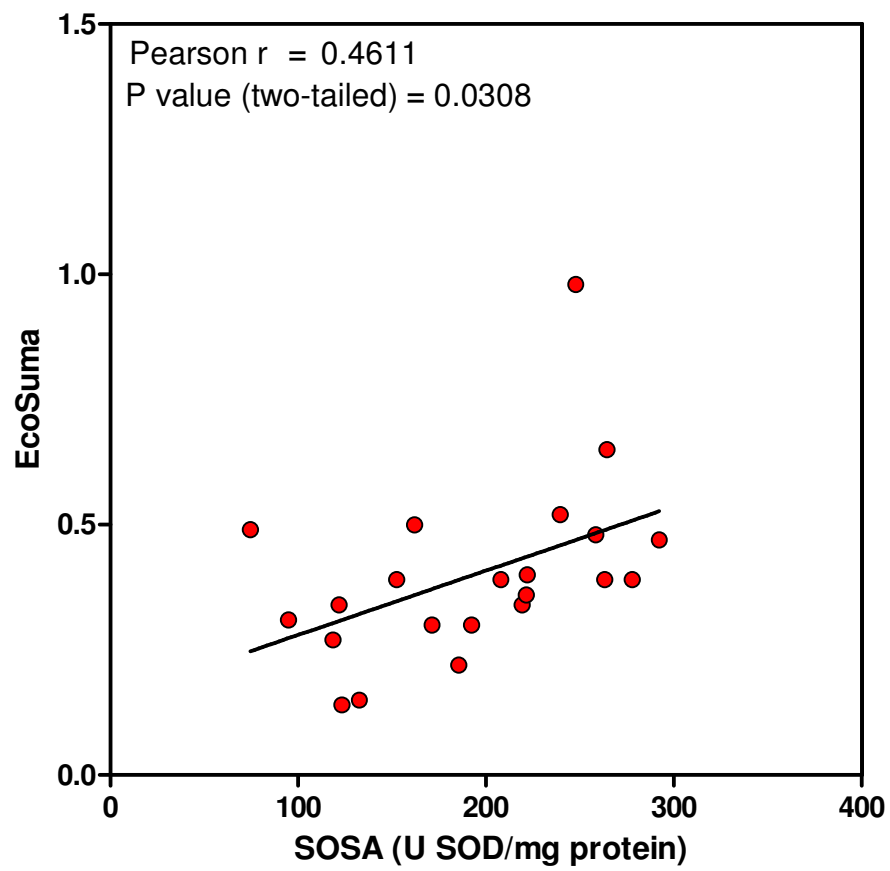


Figura 37. Correlación de los valores de EcoSuma y SOSA de los sujetos del estudio.

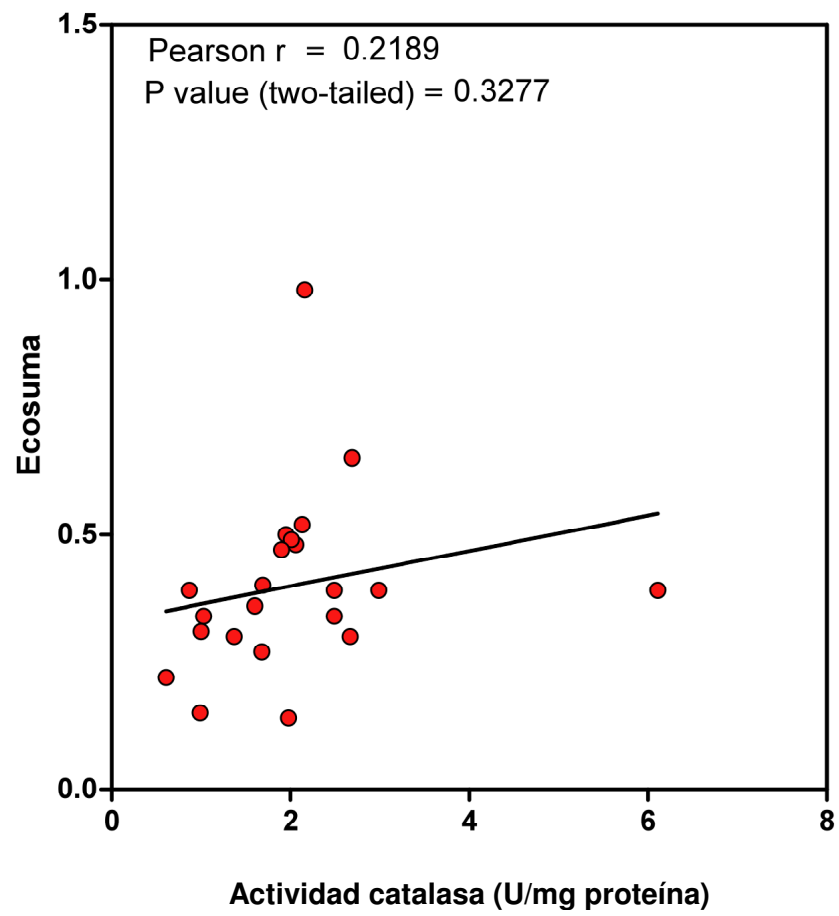


Figura 38. Correlación de los valores de EcoSuma y catalasa de los sujetos del estudio.

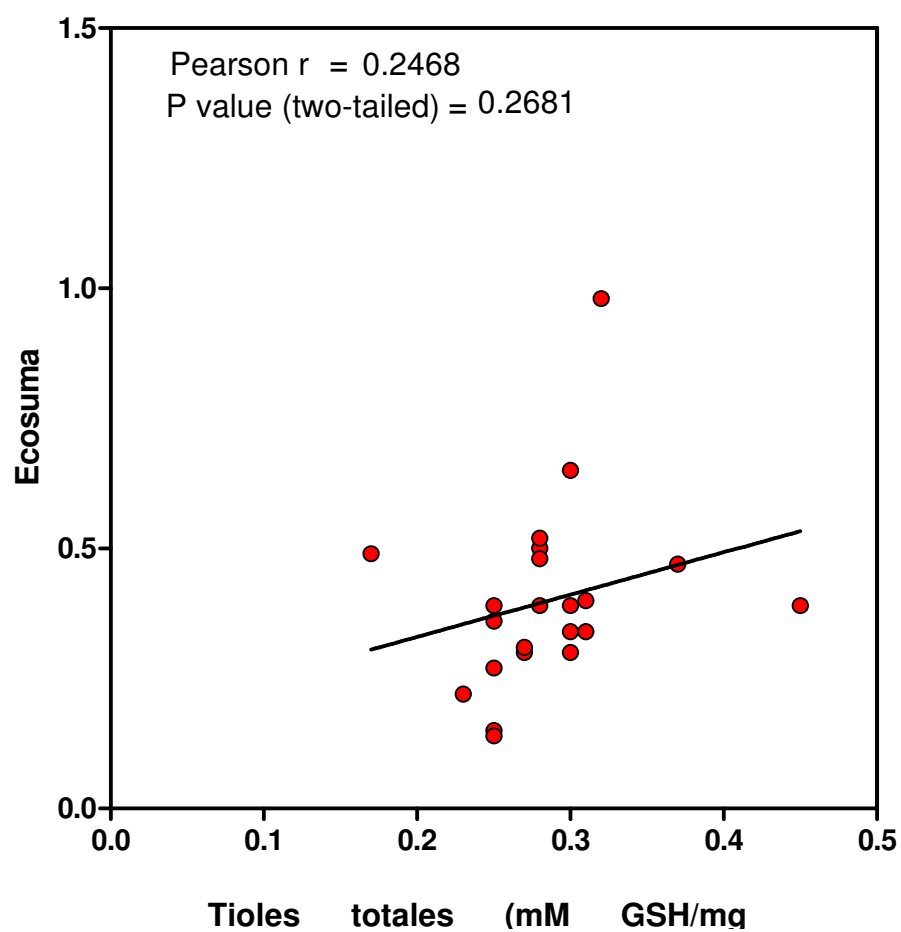


Figura 39. Correlación de los valores de EcoSuma y tioles de los sujetos del estudio.

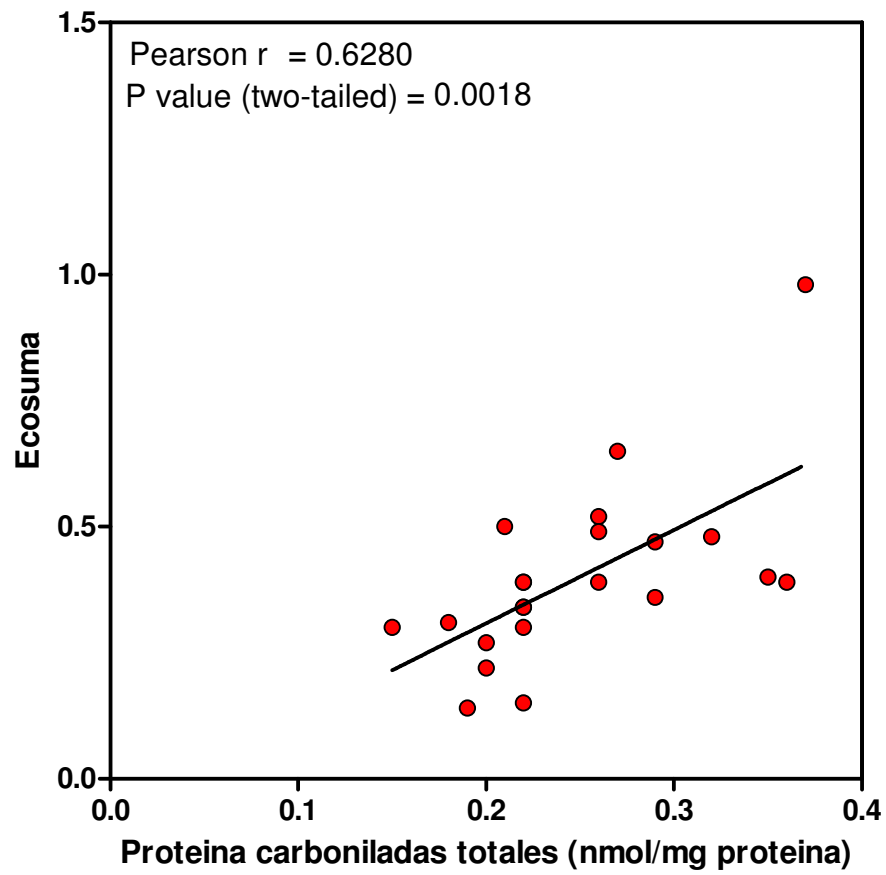


Figura 40. Correlación de los valores de EcoSuma y proteínas carboniladas totales de los sujetos del estudio.

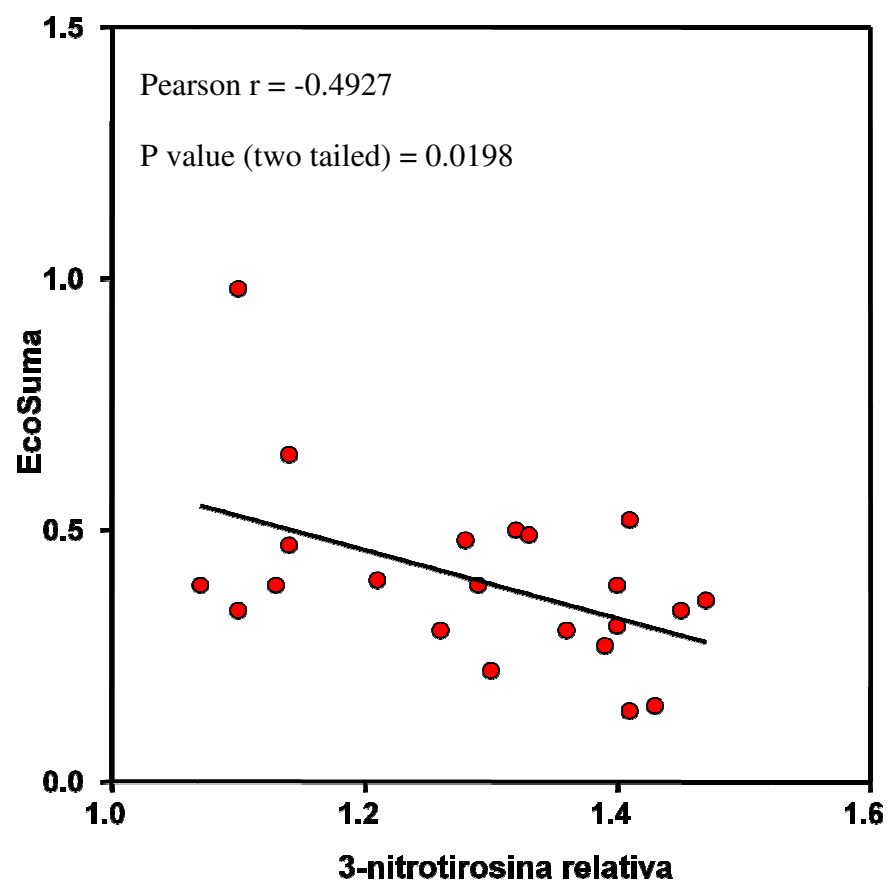


Figura 41. Correlación de los valores de EcoSuma y 3-NT de los sujetos del estudio.

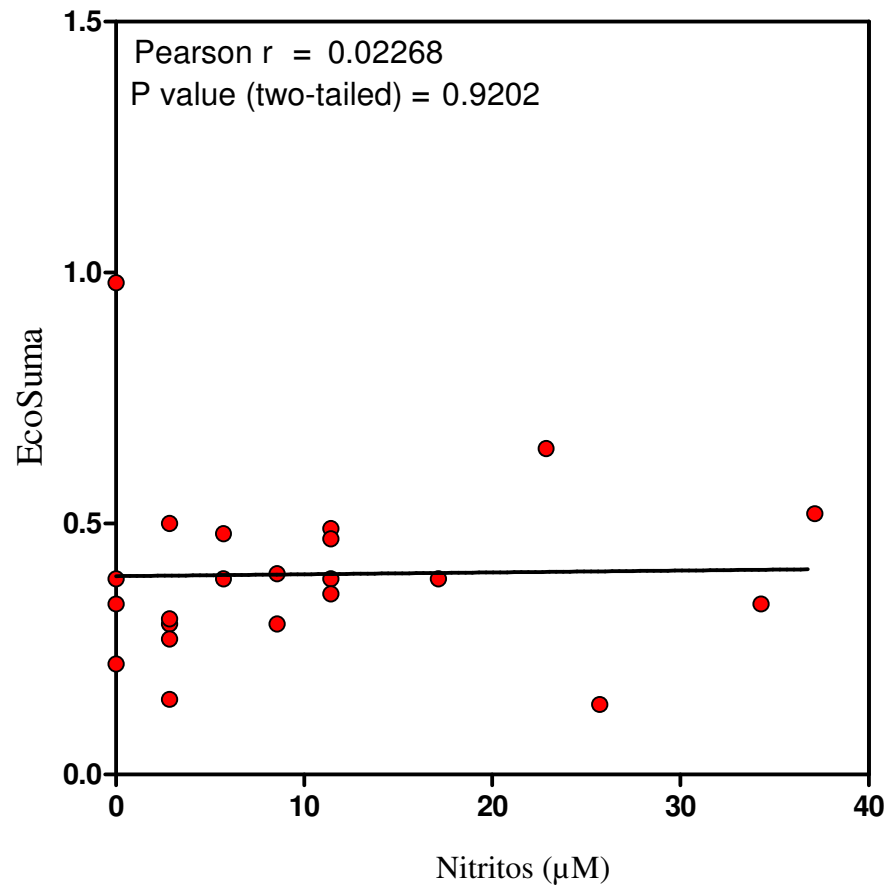


Figura 42. Correlación de los valores de EcoSuma y nitritos de los sujetos del estudio.

DISCUSIÓN

1. ENFERMEDAD VARICOSA Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

A pesar de los numerosos estudios epidemiológicos sobre enfermedad venosa crónica y varices que se han llevado a cabo, la prevalencia exacta de la enfermedad venosa crónica sigue siendo difícil de determinar debido a las variaciones en la población de estudio y los criterios de selección. La prevalencia de las varices se sitúa en rangos entre 1-60% en las mujeres y el 2-56% de los hombres (L.Robertson et al 2008). El estudio Edimburgh Vein (1999) es uno de los pocos estudios longitudinales de enfermedad venosa en todo el mundo y los resultados a doce años de seguimiento proporcionan una estimación de la prevalencia de esta condición. La evidencia sugiere que la prevalencia aumenta con la edad y que existe una asociación familiar. Las varices parecen ser más frecuentes en las mujeres, pero el embarazo, y el hecho de que las mujeres informan de la presencia de las venas varicosas con más frecuencia que los hombres, pueden jugar un papel en esta variación. La obesidad y la dieta se han propuesto como factores

de riesgo, pero se necesitan más evidencias científicas. Los hallazgos contradictorios ponen de relieve la necesidad de estudios longitudinales de buena calidad que midan la incidencia y la prevalencia de esta patología. La insuficiencia venosa crónica y las venas varicosas son a menudo ignoradas como importante problema de salud pública. Sin embargo, la evidencia de la investigación, indica que la enfermedad venosa afecta a una significativa proporción de la población y es una causa considerable de morbilidad y altera la calidad de vida de los pacientes. Lo anterior destaca la importancia de la investigación para determinar las causas de esta patología en la población general y sus factores de riesgo.

En el estudio de los factores de riesgo sobre enfermedad venosa en MMII los resultados deben ser interpretados con cautela. Los estudios ocupacionales retrospectivos y transversales son propensos a errores en la clasificación de la exposición. En los estudios retrospectivos, los pacientes pueden no ser capaces de recordar con precisión el lugar de trabajo o resumir la postura de muchos años de actividad laboral. En los estudios transversales, la postura en el momento del examen puede no reflejar la misma postura en el momento del desarrollo de la enfermedad venosa. Además existen varios problemas metodológicos que deben ser abordados. En la mayoría de los estudios poblacionales los participantes proceden de clínicas vasculares y existe un sesgo de selección. Al no ser una patología de riesgo los seguros médicos no cubren todas las opciones terapéuticas, por lo que estos pacientes que acuden al especialista pueden no tener similares variables socioeconómicas y de factores de riesgo, excluyéndose así personas con los mismos síntomas pero que no buscan ayuda médica. El error de medición también es común en estos estudios produciendo una sub o sobre estimación de la prevalencia o en los factores de gravedad y riesgo asociados. El uso de autoencuestas por los pacientes puede subestimar la prevalencia porque hay pacientes asintomáticos o con varices no visibles que no se detectan con este método. Por último, podemos citar un inadecuado control de los factores de confusión sobre todo en los estudios sobre factores de riesgo. En la mayoría de las publicaciones, los investigadores intentan controlar, ya sea por ajuste o estratificación, la edad y/o sexo en las estimaciones de prevalencia para medidas de asociación con factores de riesgo de interés. En otros casos se ha utilizado análisis

multivariante para ajustar simultáneamente múltiples factores de confusión.

En esta Tesis se han seleccionado sujetos que trabajan en bipedestación en su mayoría personal de enfermería que trabaja en quirófano o profesionales médicos quirúrgicos, así que la ocupación laboral es similar. El grupo que trabaja sentado realiza tareas en ordenador la mayor parte de su jornada laboral.

Por último señalar la complejidad de realizar estudios prospectivos a largo plazo sobre el desarrollo de la enfermedad los cuales nos darían una información más fiable sobre los factores de riesgo tanto epidemiológicos como bioquímicos implicados en el desarrollo de la enfermedad, así como la dificultad de reclutar los sujetos participantes y seguirlos a lo largo del tiempo.

2. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTADO OXIDATIVO EN PLASMA.

Históricamente se ha intentado explicar la enfermedad venosa varicosa centrándose en el mecanismo de reflujo y la alteración anatómica valvular. Investigaciones a lo largo de estos años a nivel celular y bioquímico nos han mostrado que la etiología de esta enfermedad es multifactorial y de gran complejidad. Existen tanto anomalías estructurales tisulares como bioquímicas y se relacionan con un proceso inflamatorio y oxidativo. Los estudios publicados se realizan con un número pequeño de sujetos y existe una dificultad sobreañadida para seguirlos a largo plazo. Se ha demostrado que el estrés oxidativo está en el origen y desarrollo de numerosas patologías, tales como la obesidad, la hipertensión o la Diabetes Mellitus por este motivo en esta Tesis han sido excluidos sujetos con estas patologías.

Además, entre los factores de riesgo descritos para el desarrollo de la enfermedad varicosa, se considera que las personas que tienen una actividad laboral en bipedestación asocian un riesgo mayor de desarrollo de la enfermedad. La bipedestación produce estasis venosa e isquemia, la PO_2 se reduce un 18% (Scott et al 1990) en las venas de los MMII. La reducción de pH que se produce como resultado de la acumulación de sangre y la hipertensión venosa, se traduce en

la formación de cantidades importantes de ROS (Flore et al., 2004 y 2007). La actividad laboral en bipedestación implica horas de trabajo de pie pero no necesariamente implica una ausencia de actividad física ya que en nuestro grupo, existen trabajadores con horas en ortostatismo en reposo pero también los hay que realizan movimientos de deambulación y reposo durante al menos entre 4-6 horas. Por este motivo el objetivo de este estudio ha sido determinar que ocurría con el estado oxidativo en plasma de sujetos sanos sometidos a la bipedestación.

Los estudios más completos sobre el estado redox plasmático similares al tema que tratamos en este trabajo los tenemos de diversos ensayos realizados en pacientes con varices (Glowinski and Glowinski, 2002, Wali et al, 2002, Kzysciak et Kózka, 2011 y Karatepe et al., 2010). Éstos muestran un aumento de parámetros de estrés oxidativo. El exceso de ROS procede del endotelio alterado por las condiciones de hipoxia e hipertensión venosa (Glowinski and Glowinski, 2002) y de la adventicia de las venas varicosas, ya que ésta es rica en fibroblastos y células inflamatorias productoras de ROS (Glowinski and Glowinski, 2002, Bergan, 2007). Michiels (2002 y 1993) propone como mecanismo inicial un daño isquémico que podría asemejarse a las condiciones fisiológicas que produce la bipedestación prolongada.

Los datos de biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en enfermedad varicosa son escasos y controvertidos, encontrándose tanto aumentos como disminuciones o sin cambios entre sujetos con varices y controles sanos (Flore et al., 2003, Yasim et al., 2008). Esta controversia se debe a la complejidad de los mecanismos implicados en el estrés oxidativo y a su naturaleza multifactorial (Veglia et al., 2010). En el estudio previo en el que participamos, Condezo et al., 2013, se estudiaron los biomarcadores de estrés oxidativo más usados en la patología venosa en estadios precoces. Los resultados obtenidos demuestran que el plasma de pacientes con varices primarias en estadios tempranos presenta un valor mayor de marcadores de estrés oxidativo y un valor menor en los sistemas de protección antioxidante, en comparación con los sujetos control. En conjunto todos los datos publicados indican que es posible poner de manifiesto en el plasma de pacientes con insuficiencia venosa una situación de estrés oxidativo que se ha descrito en el tejido varicoso. Es decir, el estado pro o antioxidante de un individuo puede ser

medido en plasma.

Este estudio de Condezo et al., 2013 nos ha servido como guía para valorar qué estaba sucediendo en el estado oxidativo de personas que trabajan en bipedestación, ya que tradicionalmente se ha considerado esta condición como factor de riesgo determinante en el desarrollo de varices. Al tratarse de sujetos sanos que no han desarrollado la enfermedad hablamos de estado oxidativo y estudiamos que ocurre en plasma tanto en el lado de la balanza de los mecanismos de defensa antioxidante como en el lado de la balanza que implica los marcadores de oxidación de proteínas.

En los estudios sobre patología varicosa encontramos resultados controvertidos ya que como hemos señalado anteriormente, existen diferencias en caso de estudiar plasma o de utilizar para el estudio tejido venoso. Como mecanismos de defensa antioxidante los más estudiados son los sistemas enzimáticos entre ellos la SOD, con menor frecuencia se estudia la catalasa y algunos hacen referencia a la capacidad antioxidante total. Quizá uno de los más completos publicados sea el estudio de Condezo et al 2013, realizado en plasma, donde se determinaron tanto métodos enzimáticos como capacidad general antioxidante del plasma en los estadios tempranos de la enfermedad.

La capacidad antioxidante total en esta Tesis se ha determinado con el método CUPRAC-BCS. El método mide la capacidad antioxidante por el simple principio de la reducción del ión cúprico a iones cuprosos (es decir, Cu (II) a Cu (I)). El plasma que contiene antioxidantes se mezclan con Cu (II) y la solución será reducida por los antioxidantes del plasma a Cu (I). Con este método detectamos la capacidad antioxidante del plasma de moléculas hidrofílicas tales como la vitamina C y el glutatión e hidrófobos como la vitamina E y constituyen una primera línea de defensa.

La capacidad total antioxidante plasmática no enzimática puede ser determinada mediante diferentes métodos (Bartosz, 2010). Entre ellos cabe destacar el método ORAC como el de mayor uso en muestras biológicas. En el ensayo ORAC la capacidad antioxidante de una molécula particular depende en gran medida de la sonda de detección utilizada. Otro método utilizado es el TAC, más sensible que el

ORAC, que se basa en la inhibición de la luminiscencia generada por el luminol en presencia de antioxidantes de bajo peso molecular. Este método ha sido aplicado con éxito a distintas muestras biológicas, incluido el plasma (Saleh and Plieth, 2010). La sensibilidad de esta metodología está demostrada por la necesidad de diluir casi 400 veces las muestras, lo que permite detectar pequeñas diferencias en antioxidantes no predominantes en el plasma.

Existen publicados resultados en la TAC a nivel plasmático (Condezo et al., 2013) que indican que no hay diferencias entre el plasma de sujetos controles y el de pacientes con varices primarias. En esta Tesis los resultados en la capacidad antioxidante total medida por la capacidad del plasma para reducir el Cu (II) indican que no hay diferencias entre el plasma de sujetos que trabajan sentados y sujetos que trabajan en bipedestación. Este hecho podría explicarse por tratarse de sujetos sanos en los que no se detecta una disminución en los mecanismos de defensa antioxidante generales al igual que ocurre en pacientes con varices en estadios tempranos. Otros autores demostraron una disminución de la capacidad antioxidante medida por FRAP (ferric ion reducing ability of plasma) pero en tejido varicoso (Kzysciak y Kózka., 2011). Esto nos hace pensar que algunos mecanismos de compensación actúa de forma distinta si estamos en el propio tejido venoso de las extremidades inferiores o en plasma sistémico.

La SOD, catalasa y GPx representan los sistemas de defensa antioxidante más importantes. Adicionalmente de la capacidad antioxidante total, la capacidad *scavenger* del plasma frente a $O_2^{\bullet-}$ (método SOSA) fue también analizado en la presente Tesis. Casi todos los organismos poseen SOD para detoxificar enzimáticamente $O_2^{\bullet-}$. Con este método detectamos fundamentalmente la actividad de la SOD y se basa en la inhibición de la luminiscencia que producen los secuestradores de anión superóxido del plasma una vez que éste es generado con la enzima XO. La enzima XO cataliza las purinas en dos pasos y acepta un amplio rango de sustratos. En principio cualquier quimioluminiscente con especificidad por el $O_2^{\bullet-}$ puede ser usado. Hemos utilizado la CTZ por ser muy específica para $O_2^{\bullet-}$ y ser un antioxidante natural que no produce artefactos como otros reactivos que pueden ser utilizados también (luminol, lucigenin) con este método.

En publicaciones previas en las que se ha determinado específicamente la

actividad o los niveles de SOD, se reflejan resultados contradictorios ya que a veces se trata de tejido venoso y otras se trata de determinaciones en plasma. En tejido venoso varicoso se han encontrados tanto aumento de la actividad de la enzima (Kzysciak et Kózka, 2011) como aumento de la concentración sobre todo en los fragmentos más distales de las varices (Wali et al 2002). A nivel plasmático Triankina et al., 2003 demuestran niveles disminuidos de SOD en pacientes con varices en bipedestación. Este resultado (niveles disminuidos de SOD) se ha visto previamente en plasma (Siska et Avram, 1999) de sangre extraída de extremidades inferiores con varices tras treinta minutos de bipedestación pero no hay diferencias significativas con el grupo control.

En nuestro ensayo no hemos encontrado diferencias significativas en el grupo que trabaja en bipedestación. Es posible que como ocurre en los estudios señalados no tengamos una traducción en plasma sistémico de lo que puede estar ocurriendo en plasma extraído de MMII. Además en esta Tesis hemos determinado la actividad *scavenger* frente a $O_2^{\bullet-}$ que puede implicar a otros sistemas antioxidantes no sólo a la SOD (fig 43). Estos estudios sobre enfermedad varicosa pueden estar indicando un fallo en los mecanismos de defensa antioxidante ya establecido mientras que en nuestro caso, podemos estar ante una situación de compensación en sujetos sanos que trabajan en bipedestación.

A pesar de la relevancia de la catalasa como sistema enzimático de defensa antioxidante y de señalarla junto a la SOD como una de las enzimas antioxidantes más importantes en el endotelio de venas safenas (Mickle et al., 1990), ha sido poco estudiada en las publicaciones sobre enfermedad varicosa.

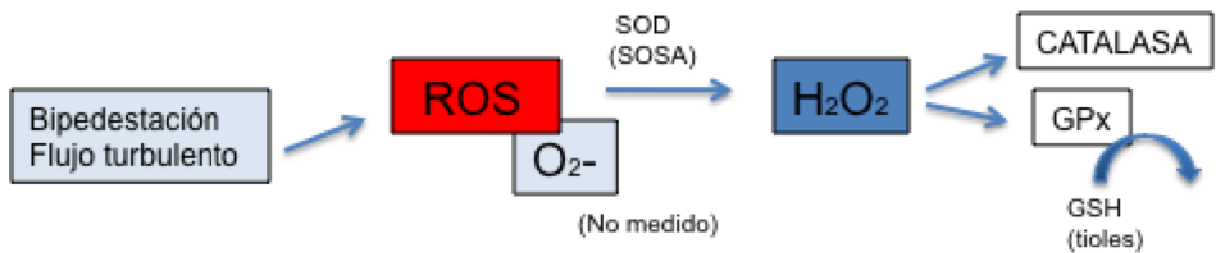


Figura 43. Esquema representativo de los diferentes puntos de actuación de las enzimas antioxidantes.

En esta Tesis hemos detectado diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la catalasa en plasma en sujetos con actividad laboral en bipedestación en comparación con sujetos que trabajan sentados, lo cual nos indica una capacidad compensadora general del plasma ante un posible aumento sistémico de ROS en estos sujetos sanos por esta vía y no por la GPx (no observamos diferencias con los tioles como veremos) ni por la SOD (fig 43). Los estudios publicados sobre aumento de ROS en sujetos con actividad laboral en bipedestación, Flore et al., 2004 y 2007, sólo detectan este aumento general de ROS que expresan en mg/dl de H_2O_2 . No profundizan en los mecanismos implicados en su detoxificación. Existen varios trabajos que publican este aumento de actividad en enzimas antioxidantes entre ellos la catalasa en sujetos sanos tras actividad física (Berzosa et al., 2011).

Si hablamos de la patología venosa, no se determina la actividad de la catalasa frecuentemente quizá porque muchos de los estudios están realizados con tejido venoso. En la patología venosa existe infiltración de células en la pared que secretan al plasma importantes cantidades de ROS (Michiels et al., 2002, Naoum et al., 2007). Es de esperar que como respuesta a este incremento del estrés oxidativo en el propio plasma, se induzca la expresión y secreción de la catalasa por células inmunitarias circulantes. A nivel plasmático encontramos dos estudios con datos sobre la catalasa. Triankina et al., 2003, detectan reducción de los niveles de catalasa en pacientes con varices, Condezo et al., 2013 muestran que la actividad

de la catalasa está disminuida significativamente en el plasma de pacientes con IVC, probablemente porque esta enzima se encontraría ante un entorno oxidante, que podría inactivarla (Gebicka and Didik, 2009). La hipótesis de que la catalasa se inactiva en un entorno antioxidante también se ha estudiado por Li et al 1992. Ellos estudian la actividad de enzimas antioxidantes entre ellas la catalasa en cultivo de células endoteliales de vena safena con PO_2 atmosférico y PO_2 baja y detectan una actividad baja antioxidante en las células cultivadas con PO_2 baja. En cambios en esta Tesis encontramos un aumento de actividad de la enzima a pesar de que la bipedestación produce un aumento de ROS al igual que se produce en situaciones de ejercicio físico con un aumento de ROS y aumento de actividad de enzimas detoxificadoras posiblemente por un mecanismo de compensación.

Los grupos tiol se encuentran en determinados aminoácidos de proteínas y en el glutatión mayoritariamente. Hemos incluido este parámetro por tratarse de un mecanismo antioxidante complementario. Además en estudios en pacientes con varices en estadios precoces es uno de los mecanismos de defensa que se induce. El GSH es un potente agente reductor que participa en diversas rutas metabólicas antioxidantes, actuando tanto como donador de protones o como cofactor. Por una parte, el GSH actúa intracelularmente como *scavenger* de diversos ROS, tal como radicales anión superóxido e hidroxilo y también puede detoxificar células de algunos RNS como el radical peroxinitrito. Además de sus acciones directas eliminando ROS y RNS, el GSH actúa como cofactor en varios sistemas enzimáticos antioxidantes. Es el cofactor de la GPx que participa en la reducción del peróxido de hidrógeno (fig 43), con la dehidroascorbato reductasa participa en la regeneración del ascorbato (Franco et al., 2007) y también regula el estado redox de proteínas (Jones, 2006). En situaciones de estrés oxidativo el GSH es consumido aumentando el nivel de glutatión oxidado (GSSG) y por lo tanto disminuye la razón [GSH/GSSG]. El GSH también puede encontrarse en el plasma, lo cual indica que cumple una función antioxidante no sólo intracelular, sino también como protector de proteínas plasmáticas.

En esta Tesis los niveles de tioles no muestran diferencias significativas entre ambos grupos estudiados. En estudios previos en pacientes con varices hay un aumento de GSH en plasma de sangre venosa de MMII tras la bipedestación lo cual

puede reflejar un mecanismo de compensación del aumento de ROS (Siska y Avram, 1999). En el estudio publicado por Condezo et al., 2013, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los pacientes con varices primarias en plasma sistémico. Estos datos remarcados nos puede indicar que el GSH se genera principalmente en el sistema venoso de MMII durante las situaciones de estrés oxidativo y no a nivel sistémico, lo que sugiere que el aumento de ROS sistémico que se produce por la bipedestación prolongada es compensado de otro modo, por ejemplo por la catalasa.

El resultado global de esta Tesis nos muestra que, ante el aumento de ROS que supone la actividad laboral en bipedestación, es compensado por mecanismos antioxidantes en el plasma.

3. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLASMA.

La implicación del NO• en la patología venosa no ha sido estudiada con la misma determinación que en la patología arterial y su papel en el desarrollo de la enfermedad varicosa requiere un esfuerzo de interpretación de los resultados. En las distintas teorías etiopatogénicas sobre la formación de las varices se describe un papel primario en el daño endotelial y se han intentado determinar los marcadores de estrés oxidativo relacionados con sustancias vasodilatadoras.

El NO• por sí mismo es difícil de cuantificar debido a su vida media muy corta en presencia de O₂ y de otras moléculas como hemoglobina. Así pues para la determinación de los niveles de NO• se han medido los productos derivados de la degradación de éste, en este caso los nitritos (NO₂⁻). Nitritos y nitratos representan los productos finales de oxidación del NO• y se consideran un índice de la producción sistémica de NO•.

Se describen varios factores que pueden influir en los niveles de estos productos como su ingesta en alimentos, aunque nosotros no hemos determinado la posible influencia de la dieta de los sujetos de esta Tesis. Además los nitritos y nitratos pueden jugar un papel en la producción de NO• bien porque los nitritos liberan NO• al reaccionar con la deoxihemoglobina o porque los nitratos de la dieta

se reducen a nitritos por las bacterias de la boca (Giustarini et al., 2008). Determinar NO_2^- en sangre es complicado por su inestabilidad y se oxidan rápidamente a nitratos. Una vez que el plasma se separa del resto de componentes de la sangre, NO_2^- y NO_3^- son estables a -20°C . Como los NO_3^- son mucho más abundantes que NO_2^- en los fluidos del cuerpo, la determinación de NO_2^- y NO_3^- es sinónimo de nitratos en la mayoría de los casos. Hemos elegido esta técnica espectrofotométrica, la reacción de Griess, porque es la más utilizada para determinar indirectamente los niveles de NO^\bullet en estudios sobre patología venosa.

Existen estudios contradictorios sobre el papel del NO^\bullet en la enfermedad varicosa. Yasim et al., 2007 intentaron determinar si factores vasodilatadores como el NO^\bullet , prostaglandinas y citocinas juegan un papel en la dilatación venosa en estadios precoces de la enfermedad concluyendo que no es así. En la patología varicosa esperaríamos encontrar un aumento de éste aunque lo que se ha demostrado es lo contrario (Hollingsworth et al., 2001). Esto se explica por el daño endotelial que existe en la pared de la vena varicosa. No se puede estudiar si en condiciones fisiológicas de estasis sanguínea las venas varicosas son capaces de responder igual a las mismas sustancias y esto refleja la disrupción entre el balance dilatador y constrictor que conlleva a un ambiente vasodilatador continuo que genera más insuficiencia venosa.

En esta Tesis describimos elevados de forma estadísticamente significativa los niveles de nitratos en sujetos que trabajan en bipedestación. En los estudios en los que se describen niveles de ROS elevados (Flore et al., 2004 y 2007) en sujetos que trabajan de pie, no se menciona el papel del NO^\bullet . Hollingsworth et al., 2001 determinan los niveles de nitritos en sujetos sanos y con varices después de simular el estasis venoso con un manguito de compresión en el muslo. Esta es la única referencia encontrada en la que se hace mención a una situación de estasis venoso en sujetos sanos y NO^\bullet . En este estudio se detectaron niveles de nitritos disminuidos en pacientes con varices respecto a los sanos de forma estadísticamente significativa. Además se puede señalar de sus resultados que en el grupo de sujetos sanos, a los que se les practicó una compresión en muslo (simulación de estasis venosa), tuvieron niveles más altos de nitritos en plasma. Esta elevación de nitritos no tenía significación estadística con respecto al grupo de sanos a los que no se les

practicó la compresión en muslo. Este resultado sin significación estadística lo explican quizá por una vida media del NO^\bullet corta, o porque se requiere un estímulo de estasis más prolongado o porque quizá sea más sensible determinar cambios en cGMP como medida del NO^\bullet .

En función de los resultados obtenidos en este estudio podemos inferir que la actividad laboral en bipedestación conlleva a un estado de vasodilatación que se traduce en plasma por un aumento de productos dependientes del NO^\bullet , es decir un aumento de nitratos.

4. BIPEDESTACIÓN, ENFERMEDAD VARICOSA Y ESTADO OXIDATIVO. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.

Ante un supuesto aumento de ROS que produce la bipedestación sería de esperar que se produjera un aumento en los productos derivados de la oxidación de los elementos plasmáticos como proteínas. Debido a que los productos de la reacción de los ROS/RNS con biomoléculas son más estables que los propios ROS/RNS, muchos de estos metabolitos estables y/o la concentración de productos diana de oxidación son medibles por diversos métodos en plasma.

Debido a los niveles significativamente elevados de nitratos y al supuesto aumento de ROS que se produce por la bipedestación sería de esperar aumento en el plasma de niveles de ONOO^- que interviene en el daño oxidativo como en la oxidación de los grupos carbonilos de las proteínas y la nitración de los residuos tirosina de las proteínas (3-NT).



Figura 44: Esquema representativo de las enzimas de detoxificación y el NO•.

Las proteínas pueden oxidarse por diferentes mecanismos como por la acción de la peroxidación lipídica o por el ataque directo de los ROS. Se ha descrito que los productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPPs) reflejan el daño oxidativo global a proteínas (Witko-Sarsat et al., 1996), pero no están correlacionados con los niveles de MDA. Tanto a nivel de tejido venoso como a nivel plasmático el marcador más estudiado de daño oxidativo en los estudios sobre enfermedad varicosa es el MDA. El contenido de carbonilos de las proteínas se puede medir por diversos procedimientos muy sensibles siendo el más utilizado el método en el que se emplea como reactivo el DNPH. Argüelles et al., 2004 describen una débil correlación entre los grupos carbonilo del suero y los de diferentes tejidos.

En el presente estudio hemos determinado el daño a proteínas a través de los niveles de carbonilos y de 3-NT presentes en plasma.

En los resultados de esta Tesis no hemos encontrado elevado en plasma de forma significativa estos marcadores de oxidación de proteínas en sujetos que trabajan de pie en relación con los que trabajan sentados. Es posible que no hayamos detectado diferencias significativas porque los sistemas antioxidantes estén compensando el aumento de ROS que produce la bipedestación mediante los mecanismos *scavenger* de anión superóxido (SOSA) y los tioles. Con ambos sistemas existe una correlación positiva y con significación estadística.

Como hemos documentado, la actividad laboral en bipedestación produce un aumento de ROS pero los sistemas de defensa antioxidantes actúan equilibrado la balanza. Hemos visto que en el análisis conjunto de carbonilos de todas nuestras muestras, existe una correlación positiva de éstos con algunos de los mecanismos antioxidantes. Esto es lo que describen algunas publicaciones como la de Berzosa et al., 2011. La actividad física se traduce en un aumento de ROS que es compensado de forma general con aumento de las enzimas antioxidantes.

En el estudio sobre patología varicosa de Condezo et al., 2013, se han confirmado niveles elevados de proteínas carboniladas en suero de pacientes con varices en estadios precoces, que están relacionados con otros aldehídos

producidos por la peroxidación lipídica además del MDA (Esterbauer et al., 1991). No se encuentra en la literatura referencia a los carbonilos en relación con la patología varicosa salvo en el trabajo de Condezo y colaboradores que nos ha servido de referente en esta Tesis. El hecho de que los niveles de MDA y proteínas carboniladas, pero no los de AOPPs, sean mayores en pacientes con varices en relación con los sujetos controles en el estudio de Condezo et al., 2013, indicaría que el daño oxidativo en la IVC está relacionado con la peroxidación lipídica.

En relación con la 3-NT no se ha determinado previamente en estudios sobre patología venosa, se ha determinado como marcador de daño oxidativo entre otros en estudios sobre aterosclerosis, a través de la nitración de las lipoproteínas de baja densidad por peroxinitrito. Como hemos visto, la actividad en bipedestación conlleva un aumento de $\text{NO}\bullet$ medido en término de NO_2^- en plasma. Hemos querido valorar si existía algún parámetro de estrés nitroxidativo en el plasma de estos sujetos a través de la participación del ONOO^- y la nitración de la tirosina.

En la determinación de 3-NT se debe tener en cuenta que hay una parte libre y otra unida a proteínas. Existen varios métodos de medida y algunas técnicas pueden sobreestimar los valores reales. Se debe señalar que los problemas metodológicos asociados a la determinación de este compuesto hacen que la información de la que se dispone sobre las consecuencias fisiológicas y patológicas de la nitración de la tirosina en seres humanos sea todavía limitada (Duncan, 2002). En nuestro caso hemos usado una técnica de inmuno ensayo con anticuerpos para estas muestras de plasma con selectividad para detectar residuos unidos a proteínas y sin afinidad por las formas libres de la 3-NT. Además de las dificultades técnicas de la determinación de la 3-NT debemos añadir la influencia de los hábitos alimenticios en el estrés nitroxidativo (Szumska et al., 2012).

Como consecuencia del aumento de nitratos y ROS (Flore et al., 2004 y 2007) que produce la bipedestación sería de esperar un aumento de la oxidación de proteínas en este grupo y sin embargo no encontramos diferencias estadísticamente significativas. El estrés nitroxidativo que supone la bipedestación prolongada no se traduce en daño por la actuación de los mecanismos de defensa. En el análisis conjunto de la 3-NT en ambos grupos, encontramos una correlación negativa entre 3-NT y SOSA y 3-NT y tioles con significación estadística. Esto se explica porque los

mecanismos de defensa antioxidantes *scavenger* de $O_2^{\bullet-}$ hacen que se produzca menos ONOO⁻. La superproducción de NO^{\bullet} hace que pueda reaccionar con $O_2^{\bullet-}$ y de esta forma se ve bloqueada esta vía (figura 44).

5. CORRELACIÓN DEL PARÁMETRO ECOSUMA Y LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS.

La etiología de la IVC es multifactorial. La diferencia en la capacidad de adaptación entre unos individuos y otros puede depender de factores genéticos y ambientales. Los estudios indican que se desconoce cuál es el proceso primario que conlleva a una incompetencia valvular y dilatación de la pared venosa, lo que se acompaña de estancamiento sanguíneo e hipoxia. En este proceso de enfermedad se describen múltiples factores epidemiológicos como antes hemos citado y entre ellos clásicamente las actividades que exigen una bipedestación prolongada. A parte de los estudios epidemiológicos que muestran una relación significativa entre enfermedad varicosa y actividad laboral en bipedestación, existen dos estudios publicados en los que se demuestra un aumento de “estrés oxidativo” en los trabajadores sanos que tienen una actividad en bipedestación y que ya hemos citado previamente (Flore et al., 2004 y 2007). Los profesionales que trabajan en bipedestación presentan hipertensión venosa en MMII, cambios en el perfil de velocidad que activan una serie de mecanismos locales que conllevan a un aumento de liberación de ROS mediante dos procesos teóricos, la quimiotaxis con activación de leucocitos y plaquetas y el daño endotelial con la oxidación de componentes de la membrana celular. Este hecho se une a la constatación de que los pacientes con enfermedad varicosa tienen un aumento de estrés oxidativo en plasma y de los marcadores de daño oxidativo (Condezo et al., 2013). Sin embargo en el estudio de Flore et al., 2004 no todos los trabajadores en bipedestación mostraron niveles de ROS elevados y por el contrario unos pocos controles tenían resultados por encima de este determinado umbral lo que nos hace pensar que otros factores podrían estar presentes a parte del fenómeno de la bipedestación en el desarrollo de la enfermedad varicosa. La respuesta apropiada para compensar esta situación, mantener la homeostasis redox y cómo este sistema se rompe; sería la clave para explicar el origen de la patología varicosa.

En los trabajos publicados sobre insuficiencia venosa y enfermedad varicosa clásicamente la selección de los sujetos sanos se determina mediante un estudio eco-doppler del sistema venoso superficial y profundo con el objetivo de excluir los sujetos con insuficiencia (reflujo) venosa. A parte de esta información, no se ha estudiado si de los datos de eco-doppler (curvas de flujo) se podrían obtener de forma práctica y sencilla más información que ayudara a explicar los mecanismos de daño oxidativo que se producen en los pacientes con enfermedad varicosa ya en estadios precoces. En esta Tesis hemos reclutado información hemodinámica sobre el estudio eco-doppler en extremidades inferiores mediante la determinación de un parámetro que hemos denominado EcoSuma; con el objetivo de correlacionar este perfil hemodinámico con el estado oxidativo de sujetos sanos que trabajan en bipedestación o en sedestación. No se ha descrito en ningún estudio previo sobre el sistema venoso un parámetro similar que nos ayude a validar el que nosotros hemos diseñado, lo que hace complicado comparar y correlacionar con estudios previos que nos ayuden a la interpretación de los resultados.

El sistema venoso de las extremidades inferiores está sujeto a grandes cambios de presión relacionados con la postura. La presión hidrostática en la posición de bipedestación es producto de la gravedad y produce hipertensión venosa. La presión hidrostática se eleva 0.8 mm Hg por centímetro desde la aurícula derecha hasta llegar a unos 80-100 mm Hg en los pies. En reposo durante la bipedestación la presión hidrostática es igual tanto en el sistema venoso superficial como en el profundo. Durante la actividad física, la bomba muscular hace que esa presión elevada caiga en ambos sistemas venosos para después ascender lentamente cuando la actividad muscular cesa (Guyton, 1996). El efecto de esta bomba muscular es necesario para producir un flujo ascendente venoso desde las extremidades inferiores hacia el corazón.

El parámetro EcoSuma se ha determinado para cada individuo del estudio en función del flujo que cada uno presenta en la región proximal de la VSI. Con el parámetro EcoSuma de nuestra Tesis hemos determinado que existen diferencias inter-individuales en el patrón de flujo venoso a nivel safeno y que esta condición conlleva una asociación positiva con marcadores de daño a proteínas, lo cual puede jugar un papel en el desarrollo de las varices en MMII. Existe un estudio publicado

(Brinsuk et al 2004) en el que se determinó la heredabilidad de la función venosa medida por pletismografía en 46 pares de gemelos. Tras ajustar los resultados en función de edad y sexo se estimó la heredabilidad de la capacidad venosa en un 30% y en un 90% la complianza. El estudio sugiere que la complianza es altamente dependiente de la composición genética y esto conlleva a un mayor riesgo de desarrollar enfermedad venosa. La historia familiar positiva se asocia fuertemente a sufrir enfermedad varicosa pero en el estudio genético de esta condición se ha descuidado la posibilidad de que la función venosa sea propia de cada individuo fenotípicamente y esto tenga un patrón de herencia. Las propiedades mecánicas del sistema venoso, como la complianza y la capacitancia, pueden ser relevantes en el desarrollo de la enfermedad varicosa y no han sido estudiadas como tal.

Existen publicados múltiples trabajos que estudian lo determinante que el esfuerzo de corte puede representar en las repuestas celulares y se ha intentado mediante estudios de simulación en cultivos celulares y mediante otras técnicas, estudiar el efecto que éste produce sobre las células endoteliales. Durante años el endotelio era considerado como un agente pasivo, sin embargo su función es activa e integradora de señales percibidas desde la sangre en función de mantener la homeostasis del sistema vascular. A través de la síntesis de mediadores, es capaz de activar las células musculares para adaptarse al *WSS* además de activar a plaquetas y leucocitos como mediadores de trombosis e inflamación. Cualquier problema en su metabolismo celular puede resultar en la alteración de sus funciones y esto llevar a cambios en la estructura vascular. Los estudios *in vitro* sobre la producción de factores endoteliales distinguen entre varios patrones de flujo: laminar, oscilante y pulsátil. Todos los datos indican que las fuerzas de cizallamiento tienen importantes efectos en los mecanismos redox endoteliales y que diferentes tipos de éstas (figura 45) generan diferentes respuestas endoteliales (Matlung H.L et al.,2009)¿Por qué no puede suceder este fenómeno en el endotelio del sistema venoso también? Nosotros recogemos en este parámetro EcoSuma un área bajo la onda de flujo venoso en el que la señal doppler venosa refleja un flujo característico para cada individuo y esta “cantidad de flujo” es distinto en cada sujeto estudiado.

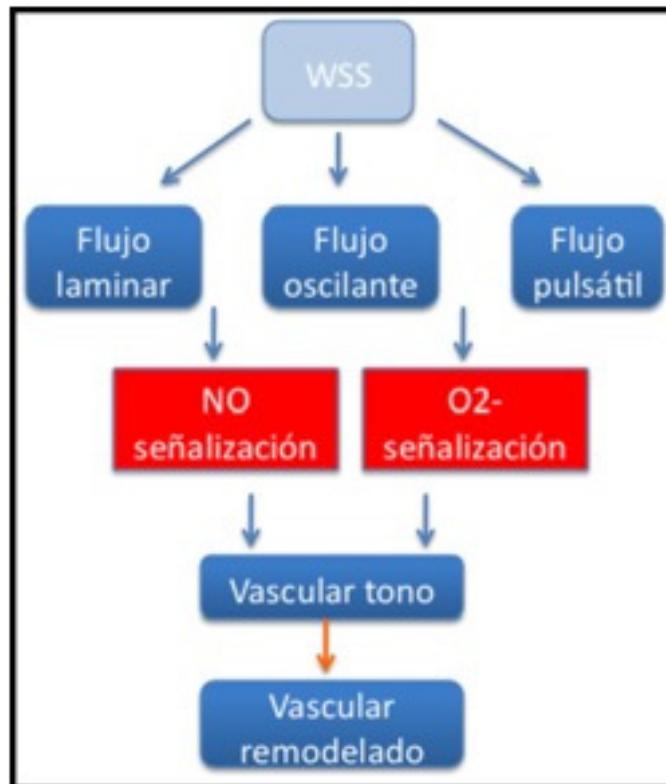


Figura 45. Esquema representativo de los distintos tipos de flujo.

El patrón de flujo que describe al sistema venoso es complicado de caracterizar ya que al contener válvulas en la luz se produce además de un flujo centrípeto continuo, turbulencias y estásis a nivel valvular. Además el tipo flujo es diferente dependiendo de la parte de la válvula.

Desde este punto de vista hemodinámico encontramos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el parámetro EcoSuma y los niveles de carbonilos plasmáticos. Esto nos indica un mayor grado de oxidación de proteínas por los mecanismos descritos como corresponde a unos determinados patrones de flujo ya sean sujetos que trabajan sentados o en bipedestación. Así pues no sólo el fenómeno de la bipedestación aumenta los ROS, sino que un factor propio de cada sujeto dependiente de las características biomecánicas de su sistema venoso puede contribuir en su estado redox.

Existen varias publicaciones en estudios arteriales que recogen que un flujo

turbulento produce un aumento de anión superóxido (De Keulenaer et al. 1998, Hua Cai et al. 2004, Mc Nally et al. 2003, Fearheller et al. 2011). Esta perturbación del flujo que ocurre en zonas de bifurcaciones arteriales explica lesiones endoteliales localizadas en estas encrucijadas a través de la producción de ONOO⁻. En nuestros resultados encontramos una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el EcoSuma y los mecanismos *scavenger* de anión superóxido (SOSA). Este hallazgo se puede interpretar como un mecanismo de compensación con aumento de actividad de la SOD en los sujetos con flujo más turbulento en el sistema venoso (De Keulenaer et al. 1998). Sin embargo no hemos detectado diferencias estadísticamente significativas entre EcoSuma y otros mecanismos de compensación antioxidantes, CUPRAC-BCS, tioles ni actividad catalasa.

El otro factor importante estudiado con diferencia estadísticamente significativa entre los sujetos que trabajan en bipedestación y sentados, es el NO[•]. En este caso no existe correlación entre la producción de nitritos y los sujetos con un parámetro EcoSuma “más turbulento”. Es posible que en estos sujetos el aumento de ROS produzca un desacople en la eNOS y se reduzca la producción de NO como señalan Fearheller et al., 2011. Además, el aumento de anión superóxido inactiva la producción de NO[•] como mecanismo de compensación para evitar la formación de ONOO⁻ (Hua Cai et al 2004). Así pues, el daño a proteínas medido a través de la posible nitración por ONOO⁻ (3-NT) muestra una correlación negativa y estadísticamente significativa y esto se explicaría por la actuación de los mecanismos antioxidantes que eliminan el anión superóxido en estas circunstancias.

Para terminar, es preciso señalar que el flujo vascular y el esfuerzo de corte son distintos dependiendo del tipo de vaso, localización y tamaño. Es posible que las células endoteliales localizadas en diferentes territorios estén sujetas a distintas adaptaciones tanto biomecánicas como bioquímicas y es preciso señalar que los cambios hemodinámicos que produce la bipedestación se traduzcan a nivel endotelial en respuestas distintas tanto si se trata del sistema venoso profundo como del superficial.

CONCLUSIONES

A. CONCLUSIONES

Las conclusiones que podemos obtener de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

-En la determinación de niveles de nitritos, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los trabajadores en bipedestación muestran niveles en plasma más elevados de los derivados del NO.

-La condición laboral en bipedestación conlleva una traducción en plasma de mediadores elevados vasodilatadores y a su compensación. Además conlleva una tendencia de elevación de ROS que se traduce en plasma en un aumento de actividad de la catalasa.

-No existen diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antioxidante total (medida por el método CUPRAC-BCS) ni en la capacidad antioxidante enzimática (medida por el método SOSA) entre los sujetos que trabajan en bipedestación y los que trabajan sentados.

-La actividad catalasa en plasma está significativamente aumentada en sujetos que trabajan de pie. Este hallazgo podría representar un mecanismo

compensador frente a activos vasodilatadores puestos de manifiesto con la actividad física y la bipedestación y que necesitan ser compensados.

-Los niveles de tioles no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos estudiados. Esto nos puede indicar que el GSH se genera principalmente en el sistema venoso de MMII durante las situaciones de estrés oxidativo y no a nivel sistémico de acuerdo a los trabajos publicados en varices.

-En el apartado de los marcadores de estrés oxidativo hallados en esta Tesis, no hemos encontrado diferencias con significación estadística ni a nivel de carbonilos ni con la 3-nitrotirosina aunque si una tendencia a estar aumentados en los sujetos que trabajan de pie. Ambos marcadores no son frecuentes en los estudios sobre patología varicosa lo que dificulta su interpretación. Nuestro objetivo era poner de manifiesto si existía un daño oxidativo relacionado con el NO y el anión superóxido que no hemos podido demostrar.

-En el estudio del parámetro EcoSuma no hemos encontrado diferencias con significación estadística entre ambos grupos de comparación. A su vez hemos correlacionado este parámetro de forma conjunta (tanto sujetos que traban de pie como sentados) con los marcadores anteriores estudiados en esta Tesis Doctoral y podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. Con el parámetro EcoSuma hemos determinado que existen diferencias inter-individuales en el patrón de flujo venoso a nivel safeno y que esta condición conlleva una asociación positiva con marcadores de oxidación de proteínas, lo cual puede jugar un papel en el desarrollo de varices.

2. Con el parámetro EcoSuma hemos determinado que existe una correlación negativa con los marcadores de nitrooxidación de proteínas, lo que nos hace pensar que el daño oxidativo en la patología venosa se produce por otros mecanismos y esto se debe a las distintas repuestas celulares que se pueden producir dependiendo del tipo de flujo (*shear stress*).

B.LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

El presente trabajo ha estudiado en el plasma de individuos sanos el efecto que puede producir la actividad prolongada en bipedestación a nivel bioquímico plasmático y si de estos datos se puede inferir información sobre los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad varicosa.

Para ello se ha tenido en cuenta la naturaleza multifactorial de esta enfermedad y el estado oxidativo y por tanto se han estudiado diversos sistemas de producción de ROS y de defensa antioxidante. No se ha realizado una evaluación exhaustiva de todos los parámetros plasmáticos, sino sólo de aquellos relevantes y cuya medida pueda ser abordada sistemáticamente sin demasiada dificultad técnica en un laboratorio de análisis clínicos.

Como novedad hemos incluido el factor de flujo venoso que hemos determinado mediante eco-doppler y que hemos llamado EcoSuma con el objetivo de, correlacionar este perfil hemodinámico con resultados a nivel plasmático de daño oxidativo. No se ha descrito en ningún estudio previo sobre el sistema venoso un parámetro similar que nos ayude a validar el que nosotros hemos diseñado, lo que hace complicado comparar y correlacionar con estudios previos que nos ayuden a la interpretación de resultados.

Estos datos abren importantes perspectivas futuras de diagnóstico. La primera de ellas sería la detección precoz de la patología en grupos de riesgo, incluso antes de la aparición de signos clínicos, mediante la evaluación de su nivel global de estrés oxidativo y el dato de eco-suma.

Sería necesaria la realización de un futuro estudio epidemiológico. Una vez realizadas estas validaciones, estos indicadores no sólo servirían como marcadores de la enfermedad, sino también para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Hoy en día los tratamientos farmacológicos de la IVC no son muy eficaces, pero es interesante resaltar que los venotónicos utilizados hasta la fecha tienen, en su mayoría propiedades antioxidantes. Es pues posible, que la detección precoz de qué tipo de alteración presenta un paciente permitiera la prescripción de determinados fármacos específicos, que estimulen sus defensas antioxidantes o que

sean *scavenger* de radicales libres. Así pues sería posible con estos datos realizar un indicador predictivo de enfermedad.

Por último señalar la dificultad de reunir sujetos sanos para este estudio de aquí el tamaño de los grupos estudiados, es posible que alguno de los valores sin significación estadística pero marginal se pudieran haber afectado con el aumento del tamaño muestral.

BIBLIOGRAFÍA

ABDUL-HUSSIEN, H., HANEMAAIJER, R., VERHEIJEN, J. H., VAN BOCKEL, J. H., GEELKERKEN, R. H. & LINDEMAN, J. H. (2009) Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content. *J Vasc Surg*, 49, 741-9.

AHMAD, S. & EVANS, W. H. (2002) Post-translational integration and oligomerization of connexin 26 in plasma membranes and evidence of formation of membrane pores: implications for the assembly of gap junctions. *Biochem J*, 365, 693-9.

AIKENS, J. & DIX, T. A. (1991) Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266, 15091-8.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ L.J, LOZANO F, MARINELLO-ROURA J, MASEGOSA-MEDINA J.A.. Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa crónica en España: estudio DETECT-IVC 2006. *Angiología*, Volume 60, Issue 1, Pages 27-36

ALLEVA R, TOMASETTI M, BATTINO M, CURATOLA G, LITTARRU GP, FOLKERS K (1995). The roles of coenzyme Q₁₀ and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (20): 9388–91.

ARGÜELLES S, GARCÍA S, MALDONADO M, MACHADO A, AYALA A. (2004) Do the serum oxidative stress biomarkers provide a reasonable index of the general oxidative stress status? *Biochim Biophys Acta*;1674(3):251-9.

ASARD, H. (2002) Ascorbate. In: Banerjee. R., ed. *Redox Biochemistry*. Hoboken: A John Wiley & Son, Inc 2008, 22-27.

ATKINSON; EPAND, RF; EPAND, RM (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free radical biology & medicine* **44** (5): 739–64

AUNAPUU, M. & AREND, A. (2005) Histopathological changes and expression of adhesion molecules and laminin in varicose veins. *Vasa*, 34, 170-5.

BABIOR, B. M., LAMBETH, J. D. & NAUSEEF, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 397, 342-4.

BADRI, H. & BHATTACHARYA, V. (2008) A review of current treatment strategies for varicose veins. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 3, 126-36.

BALLATORI, N., KRANCE, S. M., NOTENBOOM, S., SHI, S., TIEU, K. & HAMMOND, C. L. (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 390, 191-214.

BARTOSZ, G. (2010) Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res*, 44, 711-20.

BEEBE-DIMMER JL, PFEIFER JR, ENGLE JS, SCHOTTENFELD D. (2005). The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol*.15(3):175-84.

BERGAN, J. (2007) Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg*, 21, 260-6.

BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z. & FERENCIK, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65, 1865-74.

BERK, B. C., ABE, J. I., MIN, W., SURAPISITCHAT, J. & YAN, C. (2001) Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 93-109; discussion 109-11.

BERZOSA, C., CEBRIAN, I., FUENTES-BROTO, L., GOMEZ-TRULLEN, E., PIEDRAFITA, E., MARTINEZ-BALLARIN, E., LOPEZ-PINGARRON, L., REITER, R. J. & GARCIA, J. J. (2011) Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 540458.

BEYER, W. F., JR. & FRIDOVICH, I. (1987) Effect of hydrogen peroxide on the ironcontaining superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 26, 1251-7.

BJORNSTEDT, M., XUE, J., HUANG, W., AKESSON, B. & HOLMGREN, A. (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 269, 29382-4.

BLOMGREN, L., JOHANSSON, G., DAHLBERG-AKERMAN, A., THERMAENIUS, P. & BERGQVIST, D. (2005) Changes in superficial and perforating vein reflux after varicose vein surgery. *J Vasc Surg*, 42, 315-20.

BONOMINI, F., TENGATTINI, S., FABIANO, A., BIANCHI, R. & REZZANI, R. (2008) Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 23, 381-90.

BRADBURY, A. W., STONEBRIDGE, P. A., RUCKLEY, C. V. & BEGGS, I. (1993) Recurrent varicose veins: correlation between preoperative clinical and handheld Doppler ultrasonographic examination, and anatomical findings at surgery. *Br J Surg*, 80, 849-51.

BRADBURY, A., EVANS, C., ALLAN, P., LEE, A., RUCKLEY, C. V. & FOWKES, F. G. (1999) What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey. *BMJ*, 318, 353-6.

BRIGELIUS-FLOHE, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 27, 951-65.

BRINSUK M, TANK J, LUFT FC, BUSJAHN A, JORDAN J. (2004) Heritability of venous function in humans *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.24(1):207-11.

BURKITT DP, WALKER AR, PAINTER NS. (1972).Effect of dietary fibre on stools and the transit-times, and its role in the causation of disease. *Lancet*. Dec 30;2(7792):1408-12.

CADENAS, E. & SIES, H. (1998) The lag phase. *Free Radic Res*, 28, 601-9.

CADENAS, E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6, 391-7.

CAI H, MCNALLY JS, WEBER M, HARRISON DG.(2004) Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*.37(1):121-5

CAI, H. & HARRISON, D. G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87, 840-4.

CALLEJAS, J. M. & MANASANCH, J. (2004) Epidemiology of chronic venous insufficiency of the lower limbs in the primary care setting. *Int Angiol*, 23, 154- 63.

CAMPOS C, GUZMÁN R, LÓPEZ-FERNÁNDEZ E, CASADO A. (2009). Evaluation of the copper(II) reduction assay using bathocuproinedisulfonic acid disodium salt for the total antioxidant capacity assessment: the CUPRAC-BCS assay. *Anal Biochem.* Sep;392(1):37-44.

CANALI, R., COMITATO, R., SCHONLAU, F. & VIRGILI, F. (2009) The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes. *Int Immunopharmacol*, 9, 1145-9.

CARPENTIER, P. H., MARICQ, H. R., BIRO, C., PONCOT-MAKINEN, C. O. & FRANCO, A. (2004) Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. *J Vasc Surg*, 40, 650-9.

CARR, A. C., MCCALL, M. R. & FREI, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1716-23.

CATHCART, M. K. (2004) Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 23-8.

CIUFFETTI, G., LOMBARDINI, R., PASQUALINI, L., VAUDO, G. & LUPATTELLI, G. (1999) Circulating leucocyte adhesion molecules in chronic venous insufficiency. *Vasa*, 28, 156-9.

CLEAVE TL. (1959).Varicose veins, nature's error or man's? Some implications of the Darwinian theory. *Lancet.* 22;2(7095):172–175.

CONDEZO-HOYOS L, RUBIO M, M. ARRIBAS S, ESPAÑA-CAPARROS E, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ P, MUJICA-PACHECO E, CARMEN GONZALEZ M (2013) Plasmatic oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *J. Vasc Surg*, 57, 205-13

CORCOS, L., DE ANNA, D., DINI, M., MACCHI, C., FERRARI, P. A. & DINI, S. (2000) Proximal long saphenous vein valves in primary venous insufficiency. *J Mal Vasc*, 25, 27-36.

CORCOS, L., MACCHI, C., DE ANNA, D., PROCACCI, T., PERUZZI, G., GIANNELLI, F., GHERI, G. & BRIZZI, E. (1996a) The anatomical variables of the

saphenopopliteal junction visualization by radiological and echographic examinations. *Ital J Anat Embryol*, 101, 15-28.

CORCOS, L., PROCACCI, T., PERUZZI, G., DINI, M. & DE ANNA, D. (1996b) Sapheno-femoral valves. Histopathological observations and diagnostic approach before surgery. *Dermatol Surg*, 22, 873-80.

CRAPO, J. D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J. W. & CHANG, L. Y. (1992) Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10405-9.

CRQUI, M. H., JAMOSMOS, M., FRONEK, A., DENENBERG, J. O., LANGER, R. D., BERGAN, J. & GOLOMB, B. A. (2003) Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. *Am J Epidemiol*, 158, 448-56.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D. & MILZANI, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 52, 601-23.

DANIELSSON, G., EKLOF, B., GRANDINETTI, A. & KISTNER, R. L. (2002) The influence of obesity on chronic venous disease. *Vasc Endovascular Surg*, 36, 271-6.

DARKE, S. G. & PENFOLD, C. (1992) Venous ulceration and saphenous ligation. *Eur J Vasc Surg*, 6, 4-9.

DE GREY, A. D. (2002) HO₂*: the forgotten radical. *DNA Cell Biol*, 21, 251-7.

DE KEULENAER GW, CHAPPELL DC, ISHIZAKA N, NEREM RM, ALEXANDER RW, GRIENDLING KK. (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res*.;82(10):1094-101.

DEISSEROTH, A. & DOUNCE, A. L. (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev*, 50, 319-75.

DUNCAN M.W. (2003). A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*, Vol 25, Issue 3-4, 351-361

DWERRYHOUSE, S., DAVIES, B., HARRADINE, K. & EARNSHAW, J. J. (1999) Stripping the long saphenous vein reduces the rate of reoperation for recurrent varicose veins: five-year results of a randomized trial. *J Vasc Surg*, 29, 589-92.

EGAN, B., DONNELLY, M., BRESNIHAN, M., TIERNEY, S. & FEELEY, M. (2006) Neovascularization: an "innocent bystander" in recurrent varicose veins. *J Vasc Surg*, 44, 1279-84; discussion 1284.

EKLÖF, B. (2007) Classifying venous disease. In *The Vein book Vein*. Bergen J.J. Ed. Elsevier, Amsterdam.

EL, W. Y., GIANNOUKAS, A. D., GULLIFORD, C. J., SUVARNA, S. K. & CHAN, P. (2004) Saphenofemoral venous channels associated with recurrent varicose veins are not neovascular. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28, 590-4.

ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*, 186, 407-21.

ESTERBAUER, H., SCHAUR, R. J. & ZOLLNER, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11, 81-128.

EVANS, C. J., FOWKES, F. G., RUCKLEY, C. V. & LEE, A. J. (1999) Prevalence of varicose veins and chronic venous insufficiency in men and women in the general population: Edinburgh Vein Study. *J Epidemiol Community Health*, 53, 149-53.

FEAIRHELLER DL, PARK JY, RIZZO V, KIM B, BROWN MD (2011) Racial differences in the responses to shear stress in human umbilical vein endothelial cells. *Vasc Health Risk Manag*.;7:425-31

FLORE, R., SANTOLIVUDDO, A., ANTONIO, D. L., POLA, E., FLEX, A., POLA, R., MUZI, M. G., FARINON, A., RULLI, F., GAETANI, E., TONDI, P., GERARDINO, L. & GASBARRINI, A. (2003) Long saphenous vein stripping reduces local level of reactive oxygen metabolites in patients with varicose disease of the lower limbs. *World J Surg*, 27, 473-5.

FLORE R, GERARDINO L, SANTOLIVUO A, POLA R, FLEX A, DI CAMPLI C, POLA P, TONDI P (2004) Enhanced oxidative stress in workers with a standing occupation. *Occup Environ Med*;61:548–550.

FLORE R, GERARDINO L, SANTOLIVUO A, CATANANTI C, POLA P, TONDI P (2007) Reduction of oxidative stress by compression stockings in standing workers. *Occupational Medicine*;57:337–341.

FOLZ, R. J. & CRAPO, J. D. (1994) Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene. *Genomics*, 22, 162-71.

FOWKES, F. G., EVANS, C. J. & LEE, A. J. (2001) Prevalence and risk factors of chronic venous insufficiency. *Angiology*, 52 Suppl 1, S5-15.

FRANCO, R., SCHONEVELD, O. J., PAPPA, A. & PANAYIOTIDIS, M. I. (2007) The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*, 113, 234-58.

FRIDOVICH, I. (1974) Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 41, 35-97.

FRIDOVICH, I. (1975) Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 44, 147-59.

FRITZ KS, PETERSEN DR. (2011) Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chem Res Toxicol*. Sep 19;24(9):1411-9

FUKAI, T., GALIS, Z. S., MENG, X. P., PARTHASARATHY, S. & HARRISON, D. G. (1998) Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 101, 2101-11.

GEBICKA, L. & DIDIK, J. (2009) Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1375-1379.

GHISELLI A, SERAFINI M, NATELLA F, SCACCINI C. (2000). Total antioxidant capacity is a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic. Biol. Med.* 29 (11): 1106-1114.

GLASS, G. M. (1988) Neovascularization in recurrence of varices of the great saphenous vein in the groin: phlebography. *Angiology*, 39, 577-82.

GLOWINSKI, J. & GLOWINSKI, S. (2002) Generation of reactive oxygen metabolite by the varicose vein wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 23, 550-5.

GO, Y.-M. & JONES, D. P. (2011) Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 50, 495-509.

GOECKI, M., BECK, Y., HARTMAN, J. R., FISCHER, M., WEISS, L., TOCHNER, Z., SLAVIN, S. & NIMROD, A. (1991) Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic Res Commun*, 12-13 Pt 1, 401-10.

GOYAL, M. M. & BASAK, A. (2010) Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*, 1, 888-97.

GRIENDLING, K. K., SORESCU, D. & USHIO-FUKAI, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86, 494-501.

GROUSSARD, C., RANNOU-BEKONO, F., MACHEFER, G., CHEVANNE, M., VINCENT, S., SERGENT, O., CILLARD, J. & GRATAS-DELAMARCHE, A. (2003) Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol*, 89, 14-20.

GRUNEWALD, R. A. (1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 18, 123-33.

GUYTON & HALL.(1997) *Tratado de Fisiología Médica*. McGraw Hill Interamericana.9^o ed.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. (1999) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 3er ed.

HALLIWELL B AND GUTTERIDGE JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edn. Oxford: Clarendon Press.

HANNA, I. R., HILENSKI, L. L., DIKALOVA, A., TANIYAMA, Y., DIKALOV, S., LYLE,A., QUINN, M. T., LASSEGUE, B. & GRIENDLING, K. K. (2004) Functional

association of nox1 with p22phox in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 37, 1542-9.

HARRISON, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, 33, 774-97.

HAVIAROVA, Z., JANEGOVA, A., JANEGA, P., DURDIK, S., KOVAC, P., STVRTINOVA, V. & MRAZ, P. (2011) Nitric oxide synthases in varicose vein wall. *Bratisl Lek Listy*, 112, 18-23.

HAWKES, S. P., LI, H. & TANIGUCHI, G. T. (2001) Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol Biol*, 151, 399-410.

HAWKINS, C. L., MORGAN, P. E. & DAVIES, M. J. (2009) Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 965-988.

HENDERSON, J. P., BYUN, J., TAKESHITA, J. & HEINECKE, J. W. (2003) Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human inflammatory tissue. *J Biol Chem*, 278, 23522-8.

HISSIN, P. J. & HILF, R. (1976) Spectrofluorometric Measurement of Reduced Gluta. *Analytical Biochemistry*, 74, 214-226.

HOBEIKA, M. J., THOMPSON, R. W., MUHS, B. E., BROOKS, P. C. & GAGNE, P. J. (2007) Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*, 45, 849-57.

HOLLINGSWORTH SJ, TANG CB, DIALYNAS M, BARKER SG (2001) Varicose veins: loss of release of vascular endothelial growth factor and reduced plasma nitric oxide. *Eur J Vasc Endovasc Surg*.22(6):551-6.

HSIAI, T. K., CHO, S. K., REDDY, S., HAMA, S., NAVAB, M., DEMER, L. L., HONDA, H. M. & HO, C. M. (2001) Pulsatile flow regulates monocyte adhesion to oxidized lipid-induced endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 1770-6.

HURST J.K (2002). Whence nitrotyrosine?. *J. Clin. Invest.* May 15;109 (10): 1287-1289

IAFRATI, M. D., PARE, G. J., O'DONNELL, T. F. & ESTES, J. (2002) Is the nihilistic approach to surgical reduction of superficial and perforator vein incompetence for venous ulcer justified? *J Vasc Surg*, 36, 1167-74.

IBORRA-ORTEGA E, BARJAU-URREA E, VILA-COLL E, BALLÓN-CARAZAS H, CAIROLS-CASTELLOTE M.A., /2006) Estudio comparativo de dos técnicas quirúrgicas en el tratamiento de las varices de las extremidades inferiores: resultados tras cinco años de seguimiento. *Angiología*; 58: 459-68.

IWAI, S., NAKANISHI-UEDA, T., ARMSTRONG, D. & OGUCHI, K. (2008) Zymographical techniques for detection of matrix metalloproteinases. *Methods Mol Biol*, 477, 113-21.

JACOB, M. P., CAZAUBON, M., SCEMAMA, A., PRIE, D., BLANCHET, F., GUILLIN, M. C. & MICHEL, J. B. (2002) Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation*, 106, 535-8.

JIAN LIU, K. & ROSENBERG, G. A. (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 71-80.

JOHNSON, R. M., HO, Y. S., YU, D. Y., KUYPERS, F. A., RAVINDRANATH, Y. & GOYETTE, G. W. (2010) The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. *Free Radic Biol Med*, 48, 519-25.

JONES, D. P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1865-79.

JONES, D. P., CARLSON, J. L., MODY, V. C., CAI, J., LYNN, M. J. & STERNBERG, P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med*, 28, 625-35.

JOSHI, D., SINCLAIR, A., TSUI, J. & SARIN, S. (2011) Incomplete removal of great saphenous vein is the most common cause for recurrent varicose veins. *Angiology*, 62, 198-201.

KAKHLON, O. & CABANTCHIK, Z. I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*, 33, 1037-46.

KARATEPE, O., UNAL, O., UGURLUCAN, M., KEMIK, A., KARAHAN, S., AKSOY, M. & KURTOGLU, M. (2010) The impact of valvular oxidative stress on the development of venous stasis ulcer valvular oxidative stress and venous ulcers. *Angiology*, 61, 283-8.

KONYA, C. & FERDINANDY, P. (2006) Vitamin C: new role of the old vitamin in the cardiovascular system? *Br J Pharmacol*, 147, 125-7.

KOWALEWSKI, R., SOBOLEWSKI, K., WOLANSKA, M. & GACKO, M. (2004) Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol*, 23, 164-9.

KRZYŚCIAK W, KÓZKA M. (2011) Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. *Acta Biochim Pol*;58(1):89-94.

LABROPOULOS, N., GIANNOUKAS, A. D., DELIS, K., MANSOUR, M. A., KANG, S.S., NICOLAIDES, A. N., LUMLEY, J. & BAKER, W. H. (1997) Where does venous reflux start? *J Vasc Surg*, 26, 736-42.

LANDMESSER, U., DIKALOV, S., PRICE, S. R., MCCANN, L., FUKAI, T., HOLLAND, S. M., MITCH, W. E. & HARRISON, D. G. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, 111, 1201-9.

LASSEQUE, B. & CLEMPUS, R. E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285, R277-97.

LAURIKKA, J. O., SISTO, T., TARKKA, M. R., AUVINEN, O. & HAKAMA, M. (2002) Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study. *World J Surg*, 26, 648-51.

LAURINDO, F.R.M., PEDRO, MDA., BARBEIRO, H.V., PILEGGI, F., CARVALHO, M.H.C., AUGUSTO, O. & DA LUZ, P.L. (1994). Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ. Res.*, 74, 700 ± 709

LEE, S., LEE, W., CHOE, Y., KIM, D., NA, G., IM, S., KIM, J., KIM, M. & CHO, J. (2005) Gene expression profiles in varicose veins using complementary DNA microarray. *Dermatol Surg*, 31, 391-5.

LIM, C. S. & DAVIES, A. H. (2009) Pathogenesis of primary varicose veins. *Br J Surg*, 96, 1231-42.

LIM, C. S., GOHEL, M. S., SHEPHERD, A. C., PALEOLOG, E. & DAVIES, A. H. (2010) Venous Hypoxia: A Poorly Studied Etiological Factor of Varicose Veins. *J Vasc Res*, 48, 185-194.

LIOCHEV, S. I. & FRIDOVICH, I. (2002) The Haber-Weiss cycle, 70 years later: an alternative view. *Redox Rep*, 7, 55-7; author reply 59-60.

LOTITO SB, FREI B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. *Free Radic Biol Med*. Dec 15;41(12):1727-46

LOZANO, F., JIMÉNEZ-COSSÍO, J. A. & ULLOA, J. (2001) Chronic venous insufficiency in Spain. An epidemiological study (RELIEF). *Angiología.*, 53, 5-16.

MACKAY, D. (2001) Hemorrhoids and varicose veins: a review of treatment options. *Altern Med Rev*, 6, 126-40.

MALÝ I, JULÍNEK S, WINKLER L. (2010) Five years' experience in endovenous laser therapy of lower extremity varicose veins. *Int Surg.*; 95(3):221-6.

MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, RÉMÉSY C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. Jan;81(1 Suppl):230S-242S. Review.

MARKLUND, S. L. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest*, 74, 1398-403.

MARTINEZ M.C AND ANDRIANTSITOHAINA R. (2009) Circulating Microparticles in Septic Shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180:1, 100-101.

MARTINEZ, M. J., BONFILL, X., MORENO, R. M., VARGAS, E. & CAPELLA, D. (2005) Phlebotonics for venous insufficiency. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003229.

MATLUNG HL, BAKKER EN, VANBAVEL E (2009) Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxid Redox*

MAY, J. M., QU, Z. C. & MENDIRATTA, S. (1998) Protection and recycling of alphatocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys*, 349, 281-9.

MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-55.

MCCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1988) Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med*, 5, 363-9.

MEISSNER, M. H., GLOVICZKI, P., BERGAN, J., KISTNER, R. L., MORRISON, N., PANNIER, F., PAPPAS, P. J., RABE, E., RAJU, S. & VILLAVICENCIO, J. L. (2007) Primary chronic venous disorders. *J Vasc Surg*, 46 Suppl S, 54S-67S.

MENDES, R. R., MARSTON, W. A., FARBER, M. A. & KEAGY, B. A. (2003) Treatment of superficial and perforator venous incompetence without deep venous insufficiency: is routine perforator ligation necessary? *J Vasc Surg*, 38, 891-5.

MICHIELS, C., BOUAZIZ, N. & REMACLE, J. (2002) Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins. *Int Angiol*, 21, 1-8.

MICKLE DA, LI RK, WEISEL RD, TUMIATI LC, WU TW (1990) Water-soluble antioxidant specificity against free radical injury using cultured human ventricular myocytes and fibroblasts and saphenous vein endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 22(11):1297-304.

MILLER, D. M., BUETTNER, G. R. & AUST, S. D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, 8, 95-108.

MONCADA, S. & PALMER, R. M. (1991) Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin Perinatol*, 15, 16-9.

NAOUM, J. J. & HUNTER, G. C. (2007) Pathogenesis of varicose veins and implications for clinical management. *Vascular*, 15, 242-9.

NAOUM, J. J., HUNTER, G. C., WOODSIDE, K. J. & CHEN, C. (2007) Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*, 141, 311-6.

NICOLAIDES, A. N. (2003) From symptoms to leg edema: efficacy of Daflon 500 mg. *Angiology*, 54 Suppl 1, S33-44.

NIETO FJ, IRIBARREN C, GROSS MD, COMSTOCK GW, CUTLER RG.(2000) Uric acid and serum antioxidante capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*;148:131-9.

NIKI, E. (2010) Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*, 49, 503-15.

NIKOLAIDIS, M. G. & JAMURTAS, A. Z. (2009) Blood as a reactive species generator and redox status regulator during exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 490, 77-84.

NOZIK-GRAYCK, E., SULIMAN, H. B. & PIANTADOSI, C. A. (2005) Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2466-71.

NYAMEKYE, I., SHEPHARD, N. A., DAVIES, B., HEATHER, B. P. & EARNSHAW, J.J. (1998) Clinicopathological evidence that neovascularisation is a cause of recurrent varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15, 412-5.

PADAYATTY, S. J. & LEVINE, M. (2001) New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*, 164, 353-5.

PASSERINI, A. G., MILSTED, A. & RITTGERS, S. E. (2003) Shear stress magnitude and directionality modulate growth factor gene expression in preconditioned vascular endothelial cells. *J Vasc Surg*, 37, 182-90.

PASTOR, N., WEINSTEIN, H., JAMISON, E. & BRENOWITZ, M. (2000) A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*, 304, 55-68.

PAHAKIS MY, KOSKY JR, DULL RO, TARBELL JM. (2207).The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 30;355(1):228-33.

POCARD M. (1997).Varicose veins and methods used to cut them: from the Ebers papyrus to Trendelenburg. *Ann Chir.*;51(7):710-2.

PORTER JM, MONETA MG. (1995).Reporting standards in venous disease: an update. International Consensus Committee on Chronic Venous Disease. J Vasc Surg. 21:635–645.

PORTO, L. C., AZIZI, M. A., PELAJO-MACHADO, M., MATOS DA, S. P. & LENZI, H.L. (2002) Elastic fibers in saphenous varicose veins. Angiology, 53, 131-40.

PSAILA, J. V. & MELHUIISH, J. (1989) Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. Br J Surg, 76, 37-40.

PSAILA JV, MELHUIISH J (1989).Viscoelastic properties and collagen content of the long saphenous vein in normal and varicose veins. Br J Surg. 1989 Jan;76(1):37-40.

PUTZ, R., PABST, R., PUTZ, R. & SOBOTTA, J. (2006) Sobotta: Atlas de anatomía.tronco, abdomen y miembro inferior. .Ed. Médica Panamericana, 22 ed

RAFFETTO, J. D. & KHALIL, R. A. (2008a) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol, 75, 346-59.

RAFFETTO, J. D. & KHALIL, R. A. (2008b) Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. Phlebology, 23, 85-98.

RAJU-VILLAVICENCIO. (1999) Tratamiento quirúrgico de las enfermedades venosas., 1 edic. Mc Graw-Hill interamericana editores SA. (2): 17-59

RATHORE, R., ZHENG, Y.-M., NIU, C.-F., LIU, Q.-H., KORDE, A., HO, Y.-S. & WANG,Y.-X. (2008) Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKC[ϵ] signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. Free Radical Biology and Medicine, 45, 1223-1231.

ROBERTSON, L., EVANS, C. & FOWKES, F. G. (2008) Epidemiology of chronic venous disease. Phlebology, 23, 103-11.

RUTHERFORD, E. E., KIANIFARD, B., COOK, S. J., HOLDSTOCK, J. M. & WHITELEY, M. S. (2001) Incompetent perforating veins are associated with recurrent varicose veins. Eur J Vasc Endovasc Surg, 21, 458-60.

SAHARAY, M., SHIELDS, D. A., GEORGIANNOS, S. N., PORTER, J. B., SCURR, J. H. & COLERIDGE SMITH, P. D. (1998) Endothelial activation in patients with chronic venous disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 15, 342-9.

SALEH, L. & PLIETH, C. (2010) Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat. Protocols*, 5, 1627-1634.

SALES, C. M., ROSENTHAL, D., PETRILLO, K. A., JERIVS, H. S., MATSUURA, J., CLARK, M. D., PONTORIERO, M. A., SYRACUSE, D. C. & LUKA, N. L. (1998) The valvular apparatus in venous insufficiency: a problem of quantity? *Ann Vasc Surg*, 12, 153-5.

SANSILVESTRI-MOREL, P., FIORETTI, F., RUPIN, A., SENNI, K., FABIANI, J. N., GODEAU, G. & VERBEUREN, T. J. (2007) Comparison of extracellular matrix in skin and saphenous veins from patients with varicose veins: does the skin reflect venous matrix changes? *Clin Sci (Lond)*, 112, 229-39.

SANSILVESTRI-MOREL, P., RUPIN, A., JULLIEN, N. D., LEMBREZ, N., MESTRIESDUBOIS, P., FABIANI, J. N. & VERBEUREN, T. J. (2005) Decreased production of collagen Type III in cultured smooth muscle cells from varicose vein patients is due to a degradation by MMPs: possible implication of MMP- 3. *J Vasc Res*, 42, 388-98.

SCOTT, T. E., LAMORTE, W. W., GORIN, D. R. & MENZOIAN, J. O. (1995) Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case-control study. *J Vasc Surg*, 22, 622-8.

SIES, H. (1985) Oxidative stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*, edited by Sies H. London, Academic Press, 1-8.

SISKA IR, AVRAM J, TATU C, BUNU C, SCHNEIDER F, MATIES R (1999) Some aspects concerning the antioxidant capacity of venous blood in lower limbs varicose veins. *Adv Exp Med Biol*.;471:445-52.

SOMERS, P. & KNAAPEN, M. (2006) The histopathology of varicose vein disease. *Angiology*, 57, 546-55.

STONEBRIDGE, P. A., CHALMERS, N., BEGGS, I., BRADBURY, A. W. & RUCKLEY, C. V. (1995) Recurrent varicose veins: a varicographic analysis leading to a new practical classification. *Br J Surg*, 82, 60-2.

STRUCKMANN, J. R. (1999) Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction: an overview. *J Vasc Res*, 36 Suppl 1, 37-41.

STUART, W. P., ADAM, D. J., ALLAN, P. L., RUCKLEY, C. V. & BRADBURY, A. W. (1998) Saphenous surgery does not correct perforator incompetence in the presence of deep venous reflux. *J Vasc Surg*, 28, 834-8.

SZUMSKA M, WIELKOSZYŃSKI T, TYRPIEŃ K. (2012) 3-nitrotyrosine determination as nitrosative stress marker and health attitudes of medical students considering exposure to environmental tobacco smoke. *Przegl Lek.*;69(10):798-802

TAKASE, S., PASCARELLA, L., BERGAN, J. J. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. (2004a) Hypertension-induced venous valve remodeling. *J Vasc Surg*, 39, 1329-34.

TAKASE, S., PASCARELLA, L., LEROND, L., BERGAN, J. J. & SCHMID-SCHONBEIN, G. W. (2004b) Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28, 484-93.

TORRES, P., GALLEGUILLOS, P., LISSI, E. & LÓPEZ-ALARCÓN, C. (2008) Antioxidant capacity of human blood plasma and human urine: Simultaneous evaluation of the ORAC index and ascorbic acid concentration employing pyrogallol red as probe. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9171-9175.

TOUYZ, R. M. (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1302-14.

TOUYZ, R. M., CHEN, X., TABET, F., YAO, G., HE, G., QUINN, M. T., PAGANO, P. J. & SCHIFFRIN, E. L. (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res*, 90, 1205-13.

TRAUB, O. & BERK, B. C. (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 677-85.

TRANKINA SA, KOLOBOVA OI, VARSHAVSKIĬ BIA (2003) The role of peroxidation in pathogenesis of varicose veins. *Klin Lab Diagn*, 6, 19-20

TURTON, E. P., SCOTT, D. J., RICHARDS, S. P., WESTON, M. J., BERRIDGE, D. C., KENT, P. J. & KESTER, R. C. (1999) Duplex-derived evidence of reflux after varicose vein surgery: neoreflux or neovascularisation? *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 17, 230-3.

VALENTINE, J. S., PANTOLIANO, M. W., MCDONNELL, P. J., BURGER, A. R. & LIPPARD, S. J. (1979) pH-dependent migration of copper(II) to the vacant zinc-binding site of zinc-free bovine erythrocyte superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4245-9.

VALKO, M., LEIBFRTZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M. & TELSER, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

VALKO, M., MORRIS, H. & CRONIN, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, 12, 1161-208.

VAN CLEEF, J. F., HUGENTOBLE, J. P., DESVAUX, P., GRITON, P. & CLOAREC, M. (1992) [Endoscopic study of reflux of the saphenous valve]. *J Mal Vasc*, 17 Suppl B, 113-6.

VAN RIJ, A. M., JIANG, P., SOLOMON, C., CHRISTIE, R. A. & HILL, G. B. (2003) Recurrence after varicose vein surgery: a prospective long-term clinical study with duplex ultrasound scanning and air plethysmography. *J Vasc Surg*, 38, 935-43.

VASSALLE, C., MASINI, S., CARPEGGIANI, C., L'ABBATE, A., BONI, C. & ZUCHELLI, G. C. (2004) In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clin Chem Lab Med*, 42, 84-9.

VEGLIA, F., CAVALCA, V. & TREMOLI, E. (2010) OXY-SCORE: a global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro- and antioxidant markers. *Methods Mol Biol*, 594, 197-213.

VEGLIA, F., CIGHETTI, G., DE FRANCESCHI, M., ZINGARO, L., BOCCOTTI, L., TREMOLI, E. & CAVALCA, V. (2006) Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers*, 11, 562-73.

VEGLIA, F., WERBA, J. P., TREMOLI, E., SQUELLERIO, I., SISILLO, E., PAROLARI, A., MINARDI, F. & CAVALCA, V. (2009) Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXYSCORE and individual biomarkers. *Biomarkers*, 14, 465-72.

VESKOUKIS, A. S., NIKOLAIDIS, M. G., KYPAROS, A. & KOURETAS, D. (2009) Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 1371-1374.

VON ZASTROW, M., TRITTON, T. R. & CASTLE, J. D. (1986) Exocrine secretion granules contain peptide amidation activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 3297-301.

WALI, M. A. & EID, R. A. (2002) Changes of elastic and collagen fibers in varicose veins. *Int Angiol*, 21, 337-43.

WALI, M. A., DEWAN, M. & EID, R. A. (2003) Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int Angiol*, 22, 188-93.

WEISIGER, R. A. & FRIDOVICH, I. (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*, 248, 3582-92.

WHALEY-CONNELL, A., MCCULLOUGH, P. A. & SOWERS, J. R. (2011) The role of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Rev Cardiovasc Med*, 12, 21-9.

WILSON, J. X. (2005) Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr*, 25, 105-25.

WIDMER LK, KAMBER V, DA SILVA A, MADAR G.(1978).Overview:

varicosis. *Langenbecks Arch Chir. Nov*;347:203-7.

WITKO-SARSAT V., FRIEDLANDER, M., CAPELLERE-BLANDIN, C., NGUYENKHOA, T., NGUYEN, A. T., ZINGRAFF, J., JUNGERS, P. & DESCAMPSLATSCHA, B. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49, 1304-13.

WOLIN, M. S. (2011) Plasma Glutathione Peroxidase Activity is Potentially a Key Regulator of Vascular Disease-Associated Thrombosis. *Circulation*, 123, 1923-4.

WOODSIDE, K. J., HU, M., BURKE, A., MURAKAMI, M., POUNDS, L. L., KILLEWICH, L. A., DALLER, J. A. & HUNTER, G. C. (2003) Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. *J Vasc Surg*, 38, 162-9.

YASIM, A., KILINC, M., ARAL, M., OKSUZ, H., KABALCI, M., EROGLU, E. & IMREK, S. (2008) Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins. *Phlebology*, 23, 15-20.

YONG, K. & KHWAJA, A. (1990) Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev*, 4, 211-25.

YOUNG, I. S. & WOODSIDE, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-86.

ZBRODOWSKI, A., GUMENER, R., GAJISIN, S., MONTANDON, D. & BEDNARKIEWICZ, M. (1995) Blood supply of subcutaneous tissue in the leg and its clinical application. *Clin Anat*, 8, 202-7.

ZHENQUAN, J., SOUMYA, S., HONG, Z., YUNBO, L. & P., M. H. (2010) Spectrofluorometric Measurement of Reduced Glutathione Levels in Human Neuronal Cells. *Methods in Redox Signaling*.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN	1
Figura 1. Anatomía de las principales venas de las extremidades inferiores.....	4
Tabla 1. Resumen de los problemas metodológicos en los estudios epidemiológicos.....	6
Tabla 2. Estudios epidemiológicos que muestran la asociación entre actividad laboral y presencia de IVC.	8
Figura 2. Esquema de los posibles factores de riesgo implicados en la formación de las varices en MMII.....	11
Figura 3. Fisiología del flujo venoso normal y con incompetencia valvular. La foto de la izquierda muestra un esquema representativo de las consecuencias de la dilatación valvular	13
Figura 4. Ecógrafo utilizado en este estudio.....	20
Tabla 3. Esquema sobre la evidencia científica y las recomendaciones en el tratamiento médico de la IVC.	24
Figura 5. Esquema sobre las reacciones de formación y eliminación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno además de los sistemas de defensa antioxidante.	27
Figura 6. Estructura química del glutatión reducido (GSH)	38
Tabla 4. Resumen de los principales antioxidantes biológicos.	41
 MATERIAL Y MÉTODOS	 54
Tabla 5. Criterios de inclusión empleados para la participación de los sujetos en el estudio.....	56
Tabla 6. Reactivos utilizados durante la fase experimental.....	57

Tabla 7. Criterios de inclusión empleados para la selección de los sujetos participantes.....	59
Figuras 7 y 8. Imágenes ecográficas y doppler de dos secciones de la VSI. En la imagen 8 se muestra una sección de la VSI donde se ha tomado la curva doppler en ausencia de colaterales y próximo a la unión safeno-femoral. En la imagen 9 se muestra el efecto sobre la curva de flujo doppler que se produce en la región de la VSI próxima al cayado por la afluencia de las colaterales y la distorsión en el flujo que producen.	63
Figura 9. Curva doppler representativa de este sujeto seleccionada para transformar en binario con el programa de tratamiento de imágenes ImageJ. Las flechas rojas señalan la selección.....	64
Figura 10. Imagen de la curva eco-doppler transformada en binario. Las flechas rojas señalan el comienzo y el final del área seleccionada de la curva estudiada.....	65
Figura 11. Esquema representativo del cálculo del parámetro EcoSuma.....	66
Figura 12. Mecanismo de reacción en el que se basa el método CUPRAC-BCS.....	67
Figura 13. Esquema del protocolo experimental del método CUPRAC-BCS.....	69
Figura 14. Mecanismo de reacción en el que se basa el método SOSA. .	70
Figura 15. Esquema del protocolo experimental del método SOSA. 1,2,3,4 es el orden de adicción de los reactivos. (Adaptado de Saleh y Plieth, 2010)	71
Figura 16. Mecanismo de reacción entre grupos tioles y el DTNB.....	73
Figura 17. Esquema del protocolo experimental del método tioles.	74
Figura 18. Esquema de reacciones implicadas en la determinación de la actividad catalasa mediante la oxidación del Amplex Red.....	76
Figura 19. Esquema del protocolo experimental usado para medir actividad de catalasa.....	77

Figura 20. Esquema de reacción entre grupos carbonilos proteicos y la DNPH (Adaptado de Hawkins y col. 2009).....	79
Figura 21. Protocolo experimental sobre el cálculo de carbonilos.....	80
Figura 22. Detección de proteínas mediante <i>Dot Blot</i>	82
Figura 23. Esquema del protocolo experimental para la detección de 3 nitrotirosina.....	83
Figura 24. Esquema del principio de la reacción de Griess para la cuantificación de nitritos.	84
Figura 25. Esquema de protocolo experimental para la detección de nitritos.	85
RESULTADOS	87
Tabla 8. Datos demográficos y clínicos de los sujetos experimentales. .	89
Figura 26: Comparación de la capacidad antioxidante total del plasma medida mediante método CUPRAC-BCS de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico de realizó mediante t-student.	91
Figura 27. Comparación de la capacidad antioxidante frente a anión superóxido del plasma de de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico de realizó mediante t-student.....	92
Figura 28. Comparación de la actividad de la catalasa en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. * $p<0.05$ respecto individuos que trabajan en sedestación. El análisis estadístico de realizó mediante t-student.	93
Figura 29. Comparación de los niveles de tioles en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación	

(cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.94

Figura 30. Comparación de los niveles de nitratos en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. ***p < 0.001 con respecto a individuos sentados. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.....95

Figura 31. Comparación de los niveles de carbonilos en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.96

Figura 32. Comparación de los valores de 3-NT en plasma de individuos con actividad laboral en sedestación (círculos n=11) o bipedestación (cuadrados, n=11). Se representan los datos individuales y la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student.97

Figuras 33. Correlaciones entre proteínas carboniladas totales y SOSA y proteínas carboniladas totales y tioles totales. Ambas correlaciones son positivas y con significación estadística para una p< 0.05.98

Figuras 34. Correlaciones entre 3-NT y SOSA y 3-NT y tioles totales. Ambas correlaciones son negativas y con significación estadística para una p<0.05.99

Figura 35. Comparación de los valores de EcoSuma calculados de los datos de eco-doppler para los dos grupos experimentales. Los círculos representan los valores individuales en sujetos en sedestación (n= 11) y los cuadrados los valores individuales en el grupo que trabaja en bipedestación (n= 11). Para cada grupo se representa la media \pm ES. El análisis estadístico se realizó mediante t-student. 100

Figura 36. Correlación de los valores de EcoSuma y CUPRAC-BCS de los sujetos del estudio. 101

Figura 37. Correlación de los valores de EcoSuma y SOSA de los sujetos del estudio.....	102
Figura 38. Correlación de los valores de EcoSuma y catalasa de los sujetos del estudio.	103
Figura 39. Correlación de los valores de EcoSuma y tioles de los sujetos del estudio.....	104
Figura 40. Correlación de los valores de EcoSuma y proteínas carboniladas totales de los sujetos del estudio.	105
Figura 41. Correlación de los valores de EcoSuma y 3-NT de los sujetos del estudio.....	106
Figura 42. Correlación de los valores de EcoSuma y nitritos de los sujetos del estudio.	107
DISCUSIÓN	108
Figura 43. Esquema representativo de los diferentes puntos de actuación de las enzimas antioxidantes.....	116
Figura 44: Esquema representativo de las enzimas de detoxificación y el NO•.....	121
Figura 45. Esquema representativo de los distintos tipos de flujo.	126

ANEXO 1

SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR

Documento de consentimiento informado para obtención de muestras biológicas para investigaciones biomédicas

Yo, Dautorizo al Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Moncloa a conservar una muestra biológica y sanguínea que se obtendrá durante la intervención de varices y de cualquier otra intervención que se derive de la anterior.

Previamente de conceder esta autorización he sido informado/a sobre los siguientes aspectos de este consentimiento:

- 1- He recibido información sobre las razones por las que me solicitan la muestra biológica.
- 2- La muestra obtenida podrá utilizarse para investigaciones biomédicas relacionadas o no con la enfermedad o proceso que padezco, siempre que el fin último sea la mejora de la salud.
- 3- El Servicio de Angiología y Cirugía Vascular de los Hospitales La Zarzuela/La Moraleja/Moncloa garantizará la más estricta confidencialidad de los datos facilitados en cumplimiento de lo dispuesto en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal. En el caso en que la muestra biológica sea cedida a otro grupo fuera de nuestro hospital para realización de investigaciones, también se mantendrá la confidencialidad de mis datos.
- 4- En cualquier momento podré ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación o revocación de este consentimiento sin que ello conlleve una merma en la asistencia que recibo en el Hospital. La custodia de este documento se realizará por parte de la Zarzuela/La Moraleja/Moncloa.

- 5- La cesión de la muestra biológica para fines de investigación se realiza de modo altruista y voluntario, renunciando a recibir ningún tipo de compensación por la misma.

Madrid.....de.....de 20.....

Firma: